

Université de Sherbrooke

Recherche de gènes impliqués dans l'activité
ligninolytique chez Trametes versicolor

par

© Danièle Courchesne

Département de Microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès Sciences (M. Sc.)

Octobre 1986

LIVRES
RARES

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-36169-7

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vi
RESUME.....	vii
 INTRODUCTION.....	 1
1. Nature chimique de la lignine.....	1
2. Dégradation biologique de la lignine.....	2
3. Modèles de dégradation.....	4
4. Notre étude.....	8
 MATERIEL ET METHODES.....	 11
1. Culture des moisissures.....	11
2. Mesure de l'activité ligninolytique.....	13
3. Extraction du RNA.....	13
4. Passage du RNA sur colonne d'oligo dT-cellulose...	14
5. Sondes à la transcriptase inverse.....	15
6. Criblage de la génothèque de <u>Trametes versicolor</u> ..	16
7. Cartes de restriction.....	17
8. Détermination de la région induite.....	17
9. Sondes par "Nick translation".....	17
10. Analyse par "Northern blot".....	18
11. Hybridation.....	19

RESULTATS.....	20
1. Milieux de culture.....	20
2. Criblage de la g�noth�que de <u>Trametes versicolor</u> ..	24
3. Purification des clones.....	27
4. Cartographie des clones.....	36
5. Cartographie des séquences induites.....	45
6. Analyse des mRNA des gènes induits.....	46
7. Sommaire de l'analyse des clones.....	57
DISCUSSION.....	59
REMERCIEMENTS.....	66
REFERENCES.....	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Hybridation de la g��noth��que de <u>Trametes versicolor</u> avec une sonde non induite (n) et une sonde induite (i).....	26
Figure 2	Purification des clones.....	29
Figure 3	Photographie du gel qui a servi à déterminer la carte de restriction du clone 31.....	38
Figure 4	Cartes de restriction des clones d'expression différentielle isolés de la g��noth��que de <u>Trametes versicolor</u>	40
Figure 5	Hybridation du DNA du clone 15 avec le DNA de différents clones.....	44
Figure 6	Photographie des gels qui ont servi à faire des "Northern blots".....	47
Figure 7	Autoradiogrammes des "Northern blots".....	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Composition des milieux de culture synthétiques.....	12
Tableau 2	Tableau des milieux de culture utilisés.....	22

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Absorbance (nm)
bp	Paire de bases
°C	Degré Celsius
cDNA	Complementary DNA
cm	Centimètre
cpm	Coups par minute
d	Daltons
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DNA	Acide déoxyribonucléique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
EtBr	Bromure d'éthidium
g	Gramme
hnRNA	Heterogeneous nuclear RNA
Kb	Kilo paires de bases
M	Molaire
mg	Milligramme
min.	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
mRNA	RNA messenger
nm	Nanomètre
N	Normale
RNA	Acide ribonucléique
RNAse	Ribonucléase
S	Svedberg
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec.	Seconde
Tris	2-amino-2 (Hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
µg	Microgramme
µl	Microlitre

RESUME

Le but de ce travail est d'isoler des gènes qui sont impliqués dans l'activité ligninolytique de la moisissure blanche du bois. Trametes versicolor.

La dégradation microbiologique de la lignine est un phénomène mal connu. Les moisissures blanches du bois sont les organismes les plus efficaces pour dégrader la lignine mais leur mécanisme d'action est énigmatique. Bien que certains enzymes pouvant modifier la lignine ont été identifiés, le fonctionnement global du système demeure incertain. Le système ligninolytique de la moisissure n'est pas présent quand la moisissure est en phase primaire de croissance mais apparaît quand celle-ci passe en métabolisme secondaire. La lignine n'est pas un inducteur de ce système. C'est le passage de la culture en métabolisme secondaire qui induit l'activité ligninolytique. Ce passage peut être contrôlé par la concentration en azote du milieu. Il est donc possible d'obtenir des cultures avec et sans activité ligninolytique en modifiant la concentration en azote du milieu de culture. Sachant cela, nous avons pensé qu'il serait possible d'isoler des gènes qui sont exprimés de façon différentielle lors de l'activité ligninolytique, sans pour autant en connaître la fonction. Pour ce faire, il suffit d'hybrider la génothèque d'un organisme qui dégrade la lignine avec des sondes préparées à partir de cultures

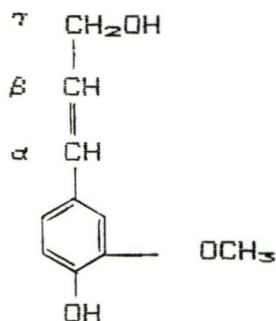
induites et non induites pour l'activité ligninolytique. Ainsi, les gènes qui seraient exprimés de façon préférentielle dans une culture ayant de l'activité ligninolytique donneraient un signal plus intense avec la sonde provenant d'une culture induite qu'avec la sonde provenant d'une culture non induite.

En suivant cette approche, nous avons criblé la génothèque de Trametes versicolor avec deux sondes différentes de cDNA effectuées à l'aide de mRNA isolés de cultures induites et non induites pour l'activité ligninolytique. Nous avons isolé 49 clones qui donnaient un signal plus intense avec la sonde induite qu'avec la sonde non induite. Sur ces 49 clones, 18 ont pu être purifiés jusqu'à homogénéité du signal. Ces 18 clones représentaient 9 gènes différents d'après leur patron de restriction. Pour la majorité de ces clones, nous avons obtenu une image d'expression différentielle sur "Northern blot". Ainsi, en utilisant une méthode d'hybridation très simple, nous sommes parvenue à purifier des gènes de Trametes versicolor ayant une expression différentielle dans certaines conditions particulières de culture. Il reste maintenant à caractériser les gènes isolés pour voir s'ils ont un rôle à jouer dans le système ligninolytique de la moisissure.

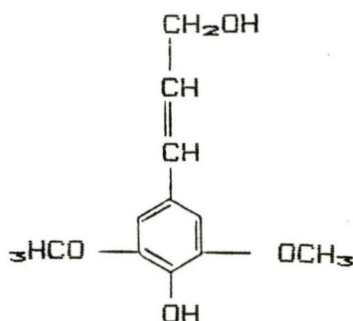
INTRODUCTION

1- Nature chimique de la lignine

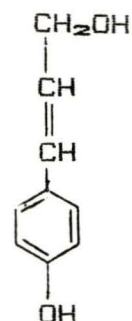
La lignine est le deuxième matériel organique renouvelable le plus abondant après la cellulose. Elle constitue de 17 à 33% en poids sec du bois (Kirk et al., 1980). La structure chimique de la lignine a été élucidée durant les années 60 (Kirk et al., 1980). C'est un polymère complexe fait d'unités para-hydroxyphényl propane qui sont liées entre elles par des liens carbone-carbone ou carbone-oxygène-carbone. Les précurseurs biosynthétiques de la lignine sont les trois alcools suivants, que l'on retrouve en proportion variée chez les différentes espèces végétales.



Alcool coniféryl



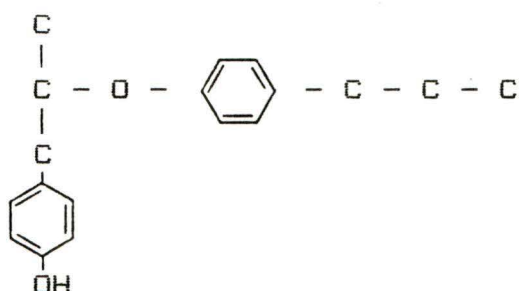
Alcool sinapyl



Alcool p-coumaryl

La lignine est formée à la suite d'une déshydrogénation oxydative des groupements phénols de ces alcools pour former des radicaux libres. Ces radicaux peuvent se coupler de façon non enzymatique pour former une grande variété de liens interphényl-propane dans une structure complexe à trois

dimensions. Les liens les plus abondants sont du type aryl glycérol β -aryl éther.



Ces liens sont non hydrolysables. La lignine n'est pas optiquement active car les deux carbones asymétriques α et β sont un mélange racémique des formes R et S.

La lignine est donc un polymère biologique inhabituel puisqu'asymétrique et non répétitif. Il est à prévoir que l'attaque enzymatique d'un tel substrat devra avoir la particularité de pouvoir reconnaître une grande variété de sites ayant des structures distinctes.

2- Dégradation biologique de la lignine

Dans la nature, la lignine peut être complètement métabolisée par les moisissures blanches du bois (Basidiomycètes). D'autres organismes tels que champignons, bactéries et levures peuvent également attaquer la lignine ou ses sous-produits de façon substantielle (Kirk et al., 1980; Odier et al., 1981; McCarthy et Broda, 1984; Borgmeyer et Crawford, 1985), mais les moisissures blanches du bois demeurent jusqu'à présent les plus efficaces et de ce fait, les plus

étudiées. Il est à noter cependant que même chez celles-ci, la dégradation de la lignine demeure un processus extrêmement lent.

Les premières études effectuées avec Phanerochaete chrysosporium, la moisissure blanche du bois la plus étudiée en ce qui a trait à la biodégradation de la lignine, ont démontré que la moisissure ne pouvait utiliser efficacement la lignine comme source de carbone pour sa croissance et que de plus, elle avait besoin d'une source de carbone et d'énergie autre que la lignine pour dégrader celle-ci (Kirk et al., 1976). Par ailleurs, le système ligninolytique n'est pas inductible par la lignine (Keyser et al., 1978). Par contre, Kirk (Kirk et al., 1978) a observé que le système ligninolytique peut être induit si la moisissure pousse sur un milieu déficient en azote, en soufre ou en carbone. En fait, l'activité ligninolytique apparaît quand la moisissure passe en métabolisme secondaire et qu'il y a synthèse d'un composé typique à ce métabolisme, l'alcool vératryl. D'ailleurs, on a remarqué que durant le métabolisme secondaire, il y a production de phénoloxydases qui, comme nous le verrons plus loin, sont impliquées dans l'activité ligninolytique.

Donc, durant le métabolisme secondaire, qui peut être induit par un manque de nutriments, plusieurs gènes sont induits y compris ceux liés à l'activité ligninolytique.

Cependant, le système ligninolytique est non spécifique puisque tel que mentionné ci-haut, cette activité n'est pas induite par la lignine (Keyser et al., 1978). De plus, le système ligninolytique peut attaquer une grande variété de composés aromatiques, y compris des lignines provenant de différentes espèces végétales (McCarthy et al., 1984) ou encore des lignines synthétiques (Kirk et al., 1980).

3- Modèles de dégradation

La dégradation de la lignine peut se diviser en deux étapes: la dépolymérisation, une activité essentiellement extracellulaire, et le catabolisme des monomères ainsi libérés, une activité fort probablement intracellulaire.

Tout modèle de dégradation de la lignine doit tenir compte de la grande hétérogénéité des liens entre les unités du polymère et de la présence de carbones asymétriques (Kirk et al., 1980). Plusieurs études ont démontré que la dépolymérisation faisait intervenir un processus oxydatif (Ishikawa et al., 1963; Hata, 1966; Kirk et Chang, 1975; Kirk et al., 1980). Ceci a amené divers auteurs à proposer l'intervention d'espèces d'oxygène activé (peroxyde d'hydrogène, radical superoxyde, radical hydroxyl, oxygène singulet) comme catalyseurs lors de la dépolymérisation de la lignine (Nakatsubo et al., 1981; Forney et al., 1982; Kutsuki et Gold, 1982). De fait, s'il y a des capteurs de radicaux libres dans le milieu de culture (Forney et al., 1982;

Kutsuki et Gold, 1982) ou s'il y a une catalase qui détruit le peroxyde d'hydrogène (Faison et Kirk, 1983), on n'observe pas d'activité ligninolytique. Cependant, la présence de ces molécules d'oxygène activé ne suffit pas pour expliquer le fonctionnement du système ligninolytique.

On avait observé qu'en présence d'un agent qui inhibe la synthèse protéique, les éléments du système ligninolytique n'apparaissaient pas (Keyser et al., 1978). Cependant, jusqu'à la fin de 1983, personne n'avait pu mettre en évidence une ou plusieurs protéines extracellulaires qui auraient un rôle essentiel à jouer dans l'activité ligninolytique, la concentration en protéines étant très faible dans le milieu extracellulaire.

En 1983-84, deux groupes (Tien et Kirk, 1983; Gold et al., 1984) ont mentionné la présence d'une protéine extracellulaire de 42 000 d dans une culture induite de Phanerochaete chrysosporium. Les auteurs proposent que cet enzyme pourrait à lui seul effectuer la plupart des coupures intermonomériques observées lors de la dégradation de la lignine in vivo. Cependant, jusqu'à présent, les tests d'activité de cet enzyme ont été effectués in vitro sur des lignines synthétiques représentant des dimères. La caractérisation de cet enzyme a démontré qu'il a besoin de peroxyde d'hydrogène pour fonctionner mais que c'est l'oxygène moléculaire qui est ajouté au substrat suite à

l'oxydation subséquente à l'attaque enzymatique (Gold et al., 1984; Tien et Kirk, 1984). C'est une hémoprotéine (un protohème IX par molécule d'enzyme) (Tien et Kirk, 1984) qui fonctionne de façon oxydative et qui est plus ou moins spécifique pour le substrat. Quand cet enzyme attaque une molécule, il a la particularité de produire un cation qui réagit par la suite avec l'oxygène moléculaire (Kersten et al., 1985). La régulation de cet enzyme, la "ligninase", est fortement associée à l'activité du système ligninolytique (Faison et Kirk, 1985). Cependant, la correspondance n'est pas parfaite et la présence de cet enzyme ne peut expliquer totalement le fonctionnement du système ligninolytique. Il est donc probable que d'autres gènes sont impliqués dans la dégradation de la lignine in vivo. D'ailleurs, les mutants qui ne peuvent dégrader la lignine sont souvent des mutants pléiotropiques au niveau du métabolisme secondaire (Gold et al., 1982).

Un autre enzyme pouvant jouer un rôle dans le système ligninolytique a été caractérisé (Glenn et Gold, 1985; Paszczynski et al., 1986). Il s'agit d'une peroxydase Mn-dépendante produite chez Phanerochaete chrysosporium. Cet enzyme, contrairement à la ligninase, n'est pas extracellulaire mais reste plutôt associé au mycélium. Cette peroxydase peut oxyder des composés non phénoliques mais a aussi une action de phénoloxydase. La ligninase et cette

peroxydase agissent toutes deux sur des composés modèles de la lignine mais ces deux enzymes ont des spécificités de substrat différentes. D'autres enzymes peuvent s'attaquer à la lignine. La laccase, par exemple, est une phénoloxydase produite par certains microorganismes (dont Trametes versicolor). Son action sur la lignine en est une d'oxydation. S'il n'y a pas d'agent réducteur (exemple: cellobiose-quinone oxydoréductase) dans le milieu pour réduire les intermédiaires oxydés, la laccase produira une polymérisation additionnelle de la lignine. Enfin, notons que les mutants phénoloxydases sont en général moins aptes à dégrader la lignine (Gold et al., 1982; Liwicki et al., 1985).

Aucun des enzymes mentionnés plus haut ne peut à lui seul expliquer le fonctionnement du système ligninolytique. Cependant, l'action combinée de ces enzymes plus la présence de composés ou d'enzymes supplémentaires (exemple: cellobiose-quinone oxydoréductase) pourraient expliquer une bonne partie du fonctionnement de ce système. Par contre, aucun gène ne semble être vraiment indispensable au fonctionnement du système ligninolytique. Plusieurs gènes induits lors du métabolisme secondaire pourraient avoir une fonction similaire et être facilement interchangeables pour que l'activité ait lieu. Il semblerait que les moisissures dégradent la lignine presque par accident. Lors du métabolisme secondaire, plusieurs gènes sont induits,

certaines protéines sont exportées hors de la cellule et leur activité est mise à contribution pour dégrader la lignine. Il faut rappeler que la dégradation de la lignine est un processus très lent.

4- Notre étude

Dans notre laboratoire, nous voulons cloner les divers gènes pouvant être impliqués dans la dégradation de la lignine. Cependant, suite aux observations ci-dessus, il était à prévoir que beaucoup de ces gènes soient encore inconnus. Or, les techniques de clonage conventionnelles reposent la plupart du temps sur la connaissance du produit du gène ou de sa fonction. Pour contourner ce problème, nous avons décidé d'utiliser une technique dite différentielle, c'est-à-dire qui permet de cloner des gènes sur la seule base qu'ils sont exprimés ou non. Nous avons donc cloné des gènes qui sont exprimés plus fortement dans une culture ayant une activité ligninolytique que dans une culture qui n'en a pas. Pour cela, nous devions déterminer deux conditions de culture pour la moisissure: une dans laquelle il n'y avait pas d'activité ligninolytique, l'autre dans laquelle l'activité était maximale. A partir de là, il suffisait d'extraire le RNA de chacune de ces cultures et de se servir de ceux-ci comme sonde pour aller chercher des gènes qui sont exprimés de façon préférentielle dans une culture induite pour l'activité ligninolytique. En effet, les gènes induits devraient donner

un signal plus intense avec une sonde provenant d'une culture induite qu'avec une sonde provenant d'une culture non induite.

Afin de mesurer l'activité ligninolytique de différents organismes, plusieurs méthodes ont été utilisées (Kirk et al., 1980). Au début, on a mesuré la baisse en poids de la lignine ajoutée au milieu de culture et on a analysé les produits de dégradation. Cette méthode s'est révélée longue et peu sensible. Par la suite, de la lignine naturelle ou synthétique marquée au ^{14}C a été utilisée comme substrat. La mesure de l'activité ligninolytique est donnée par la libération du $^{14}\text{CO}_2$ ainsi que par la production de molécules solubles radioactives, la lignine étant un polymère insoluble en milieu aqueux. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible et c'est la plus utilisée. Cependant, dans le cas de mesures faites à partir de lignine naturelle, la valeur des mesures dépend de la pureté de la lignine. Sinon, on risque de mesurer la dégradation d'autres composantes contenant du ^{14}C . De plus, quand l'activité ligninolytique est donnée par la libération de $^{14}\text{CO}_2$, il est à noter qu'on mesure alors la somme des activités intra et extracellulaires de l'organisme étudié.

En 1983, l'équipe de Gold (Glenn et Gold, 1983) a publié une méthode pour mesurer l'activité ligninolytique chez Phanerochaete chrysosporium. Certains polymères aromatiques

peuvent être décolorés par le système ligninolytique de la moisissure. A l'aide de cette méthode, on mesure un phénomène exclusivement extracellulaire, vu la taille de ces polymères. Ces composés possèdent un coefficient d'extinction élevé, ce qui permet d'en suivre la décoloration au spectrophotomètre. C'est une méthode simple, facile à utiliser et c'est celle-ci que nous avons choisie.

La source de gènes que nous avons utilisée pour notre étude est la moisissure blanche du bois Trametes versicolor. C'est un organisme aussi efficace que Phanerochaete chrysosporium pour dégrader la lignine (Evans et Palmer, 1983) qui a de plus l'avantage de produire de la laccase en abondance. Les propriétés du système ligninolytique de cette moisissure ressemblent à celles du système ligninolytique de Phanerochaete chrysosporium.

MATERIEL ET METHODES

1- Culture des moisissures

La souche de Trametes versicolor (ATCC 42530) est cultivée en milieu liquide dans des erlenmeyers de 125 ml ou de 2 litres contenant respectivement 25 ml et 300 ml de milieu. Les cultures ne sont pas agitées et poussent à la température de la pièce. Les petites cultures qui servent d'inoculum ont poussé dans 25 ml d'extrait de malt 1.5% (Difco Laboratories) et sont âgées d'environ 7 jours. Pour l'ensemencement, ces petites cultures sont rincées avec du milieu pauvre en azote et sont brisées dans un omnimixer (2 x 15 sec.). On met environ 1/2 petite culture pour ensemen- cer une culture de 300 ml. Pour faire pousser les cultures desquelles on extrait le RNA, on utilise un milieu synthétique (Malmström et al., 1958) contenant des concentrations en azote similaires à celles décrites par Kirk (Kirk et al., 1978) (voir tableau 1). La source de carbone est le glucose ou la cellulose. La concentration en azote est environ 13 fois plus élevée dans les cultures non induites pour l'activité ligninolytique (33.3 mM d'atomes d'azote) que dans les cultures induites pour l'activité ligninolytique (2.58 mM d'atomes d'azote). L'extraction des RNA des cultures non induites se faisait au jour 7 (avec le glucose comme source de carbone) ou au jour 12 (avec la

Tableau 1

Composition des milieux de culture synthétiques

Composante	Milieu riche en azote (non induit)	Milieu pauvre en azote (induit)
Source de carbone	Glucose ou cellulose 20g/litre	Glucose 20g/litre
L-Asparagine	1.66×10^{-2} M	6.6×10^{-4} M
NH ₄ NO ₃	-----	6.2×10^{-4} M
KH ₂ PO ₄	3.67×10^{-3} M	3.67×10^{-3} M
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.03×10^{-3} M	2.03×10^{-3} M
CaCl ₂ .2H ₂ O	6.8×10^{-5} M	6.8×10^{-5} M
FeSO ₄ .7H ₂ O	3.6×10^{-5} M	3.6×10^{-5} M
MnCl ₂ .4H ₂ O	5.1×10^{-6} M	5.1×10^{-6} M
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3.5×10^{-6} M	3.5×10^{-6} M
CuSO ₄ .5H ₂ O	4.0×10^{-6} M	4.0×10^{-6} M
DL-Phénylalanine	9.08×10^{-4} M	9.08×10^{-4} M
Thiamine/HCl	1.48×10^{-7} M	1.48×10^{-7} M

cellulose comme source de carbone). Pour les cultures induites, les RNA étaient extraits entre les jours 13 et 20. Nous avons aussi utilisé une culture en extrait de malt de 7 jours comme culture non induite.

2- Mesure de l'activité ligninolytique

On mesure l'activité ligninolytique des cultures par la décoloration du poly B-411 (Glenn et Gold, 1983). Brièvement, on ajoute 150 μ l de poly B-411 (Sigma P-0276), en solution 2% dans l'eau, à 10 ml de milieu extracellulaire. On mesure l'absorbance contre de l'eau à $\lambda = 483$ nm et $\lambda = 593$ nm en fonction du temps. A chaque mesure, on prélève 0.5 ml du mélange milieu extracellulaire - poly B-411 qu'on dilue 1:5 avec de l'eau. La mesure de l'activité est donnée par la baisse du rapport A_{593nm}/A_{483nm} dans le temps.

3- Extraction du RNA

Le RNA des cultures est toujours extrait d'après la méthode de Timberlake (Timberlake et al., 1977; Timberlake, 1980). On homogénéise le mycélium dans un omnimixer (2 x 15 min., 1 x 5 min.) en présence d'une solution d'acide p-aminosalicylique (sel de sodium) 6%, d'acide tri-isopropyl naphthalène sulfonique (sel de sodium) 1%, de 10 mM Tris/HCl pH 7.8, à laquelle on a rajouté du phénol-crésol (10:1), des billes de verre de 75-150 microns (Sigma G-3753) et du chloroforme-alcool iso-amyle (24:1). Le système est refroidi

dans la glace durant l'homogénéisation. On centrifuge à la température de la pièce pour séparer les phases. On récolte la phase aqueuse sur laquelle on fait deux extractions phénol-chloroforme-alcool iso-amyle (25:24:1) puis deux extractions chloroforme-alcool iso-amyle (24:1) de 15 min. chacune. On précipite le RNA avec deux volumes d'éthanol (+ 0.1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2). On récupère le RNA par centrifugation. On le conserve dans l'éthanol 70% à -70°C jusqu'à l'utilisation.

4- Passage du RNA sur colonne d'oligo dT-cellulose

Le RNA total est passé sur colonne d'oligo dT-cellulose (BRL) selon la méthode décrite par Maniatis (Maniatis et al., 1982). On resuspend le culot de RNA (1-5 mg) dans le tampon utilisé pour déposer l'échantillon sur la colonne (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 0.5M NaCl, 0.1% SDS). A partir de ce moment, toutes les solutions, les pipettes et les tubes utilisés sont traités au DEPC 0.1% pour inactiver les RNases contaminantes. Quand les solutions contiennent du Tris, elles ne peuvent être traitées au DEPC alors elles ne sont qu'autoclavées. On chauffe le RNA 5 min. à 68°C, on le laisse refroidir à la température de la pièce puis on le dépose sur une colonne d'oligo dT-cellulose de 2 ml équilibrée avec le même tampon, colonne qui a été préalablement lavée au NaOH et rincée à l'eau. On passe l'échantillon trois fois sur la colonne, au rythme de 4-8

gouttes par minute, en chauffant le RNA à 68°C entre chaque passage. On rince la colonne avec 10 volumes du même tampon puis avec une solution 0.1M NaCl. On élue les mRNA avec une solution sans NaCl. On précipite avec 2.5 volumes d'éthanol (+0.1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5.2). On récupère les mRNA par centrifugation.

5- Sondes à la transcriptase inverse

On utilise environ un μg de mRNA qui a subi un passage sur colonne d'oligo dT-cellulose pour faire une sonde. On chauffe ce RNA à 100°C 5 min. puis on le refroidit dans la glace. Le marquage se fait avec 50 μCi de dATP marqué au ^{32}P à 400 Ci/m mole dans un volume final de 25 μl . La réaction se fait 1 heure à 37°C en utilisant les conditions suivantes:

- . 50 unités de transcriptase inverse (BRL)
- . 100 mM Tris/HCl pH 8.3
- . 10 mM MgCl_2
- . 10 mM DTT
- . 50 mM KCl
- . 4 mM pyrophosphate de sodium
- . 1 mM de chacun des nucléotides froids dGTP, dCTP, dTTP
- . 20 $\mu\text{g/ml}$ d'oligo dT (Sigma O-2127) comme amorce
- . 18 unités de RNAsine (Amersham)

Par la suite, on hydrolyse le RNA dans du NaOH 0.3N à 37°C pendant au moins 3 heures en présence de 10 mM EDTA. La sonde est passée sur colonne de Séphadex G-50 pour se

débarrasser des nucléotides libres.

6- Criblage de la génothèque de *Trametes versicolor*

La génothèque a été préparée dans nos laboratoires par Pierre Trudel de la façon suivante. Le DNA de *Trametes versicolor* a subi une digestion partielle par l'enzyme Sau3A. Les fragments purifiés (d'environ 10 Kb) ont été clonés au site BamHI du phage λ L47.1 (gracieusement fourni par le laboratoire du Dr Jean-Paul Thirion). Quatre cent cinquante mille recombinants ont ainsi été produits. Le criblage de la génothèque a été effectué sur un grand pétri (22 cm x 22 cm) contenant environ 50 000 plages. Ces phages provenaient d'une amplification sur milieu solide de 250 000 phages de la g  noth  que originale. On a utilisé la souche d'*Escherichia coli* 803 (suII, suIII, hsdR, gal1, gal2, met B, thy A). Le transfert du DNA a été effectué selon la méthode de Benton et Davis (1977). On a déposé successivement sur le pétri 4 filtres de nitrocellulose BA 85 (Schleider et Schuell), A, B, C, D. Les filtres A et D ont été hybridés avec la sonde induite (10×10^6 cpm/filtre) alors que les filtres B et C ont été hybridés avec la sonde non induite (10×10^6 cpm/filtre). Les clones qui donnaient un signal différentiel ont été purifiés en utilisant la même technique sauf que:

- . les purifications se font sur pétri de 90 mm avec environ 100 plages par pétri
- . on met précisément environ 2×10^6 cpm/filtre

. le nitrocellulose est de marque Millipore (HATF 08225)

7- Cartes de restriction

Les enzymes utilisés (BamHI, SalI, EcoRI, HindIII, KpnI, SstII) proviennent de Boehringer Mannheim, Amersham ou BRL et ont été utilisés tel que recommandé par le manufacturier. L'électrophorèse est faite sur gel d'agarose 0.7% (Seakem ME Agarose FMC) à 30 volts pendant 16 heures (Chartrand et al., 1981) en ayant pris soin de mettre sur le gel des marqueurs de poids moléculaire.

8- Détermination de la région induite

Afin de déterminer plus précisément la portion du fragment du clone qui code pour la région induite, on effectue à l'aide d'enzymes de restriction diverses digestions des clones. Après électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%, on effectue le transfert (Southern, 1975) du DNA sur nitrocellulose BA 85 (Schleider et Schuell). On hybride ce filtre avec une sonde faite à l'aide de la transcriptase inverse sur des mRNA provenant d'une culture induite.

9- Sondes par "Nick translation"

Les sondes de DNA se font selon la méthode de Rigby (Rigby et al., 1977) et sont passées sur colonne de Séphadex G-50 ou G-75.

10- Analyse par "Northern blot"

Les "Northern blots" ont été effectués avec des RNA ayant subi un passage sur colonne d'oligo dT-cellulose. L'électrophorèse des mRNA (environ 10 µg/piste) se fait sur gel dénaturant au glyoxal (McMaster et Carmichael, 1977 avec les modifications apportées dans Maniatis et al., 1982) ou sur gel dénaturant à la formaldéhyde (Rave et al., 1979 avec les modifications apportées dans Meinkoth et Wahl, 1984). L'électrophorèse se fait à 80 volts pendant 3-5 heures en utilisant le montage décrit par Maniatis (Maniatis et al., 1982) pour faire recirculer le tampon. Après la migration, on ne colore pas au bromure d'éthidium les pistes qui serviront au transfert. Cependant, pour pouvoir visualiser les échantillons, des pistes contenant les mêmes échantillons sont colorées indépendamment du reste du gel. Pour se débarrasser de la formaldéhyde, on fait tremper le gel 3 x 20 min. dans du tampon phosphate 0.01M pH 6.5. Pour certains "Northern blots", on a traité au NaOH le gel dénaturant à la formaldéhyde pour améliorer le transfert (Maniatis et al., 1982). Le transfert se fait comme pour des "Southern blots" (Southern, 1975). Après le transfert (12-16 heures), on trempe le nitrocellulose dans du 20xSSC (3M NaCl, 0.3 M citrate de sodium), on sèche environ une heure à la température de la pièce puis on cuit deux heures à 80°C.

11- Hybridation

L'hybridation des filtres a été faite selon van der Ploeg (van der Ploeg et Flavell, 1980) avec des modifications mineures (Chartrand et al., 1981). Seules les hybridations des "Northern blots" se font en présence de sulfate de dextran (Pharmacia 17-0340-01).

RESULTATS

1- Milieux de culture

Notre approche étant d'isoler des gènes exprimés de façon différentielle lors de l'activité ligninolytique chez Trametes versicolor, notre première tâche a été de définir deux conditions de culture: une où il y aurait expression des gènes impliqués dans l'activité ligninolytique et l'autre où les gènes ne seraient pas exprimés.

A cette fin, plusieurs milieux de culture ont été évalués quant à leur capacité à induire l'activité ligninolytique de Trametes versicolor, cette activité étant déterminée par la décoloration du poly B-411 (voir introduction). Le tableau 1 (voir matériel et méthodes) nous donne la composition des principaux milieux de culture qui ont été choisis pour effectuer notre étude. La différence majeure entre les milieux dits induit et non induit est la concentration en azote. Le milieu induisant l'activité ligninolytique (milieu induit) contient une faible concentration en azote alors que le milieu n'induisant peu ou pas l'activité ligninolytique (milieu non induit) contient une forte concentration en azote. Ces concentrations d'azote sont semblables à celles utilisées par Kirk (Kirk et al., 1978) pour obtenir des cultures de Phanerochaete chrysosporium avec et sans activité ligninolytique. Il est à noter que la source d'azote n'est pas exactement la même pour

les deux milieux (induit: L-Asparagine + nitrate d'ammonium, non induit: L-Asparagine seulement). La seule autre différence entre les deux types de milieu pouvait être la source de carbone. On a utilisé de façon constante le glucose pour les milieux induits tandis que pour les milieux non induits, on a utilisé soit la cellulose ou le glucose. Avec la cellulose, nous ne mesurons aucune activité ligninolytique détectable mais la masse cellulaire de la culture demeurerait faible et nous ne pouvions en extraire suffisamment de matériel pour faire des "Northern blots". C'est pour cette raison que nous avons aussi utilisé le glucose comme source de carbone dans les cultures non induites. De cette façon, la culture a une légère activité ligninolytique mais la masse cellulaire est beaucoup plus importante. Si on avait rapporté l'activité de chacune de ces cultures par unité de poids, la différence d'activité entre ces deux milieux aurait été minime.

Le tableau 2 met en relation les milieux que nous avons utilisés pour notre étude, avec la source de carbone, la concentration en azote, l'âge de la culture au moment de l'extraction des mRNA, l'activité ligninolytique moyenne de la culture mesurée à l'aide du poly B-411 ainsi que l'utilisation qui a été faite des préparations de mRNA. On constate que les milieux de culture non induits contenaient environ 13 fois plus d'azote que les milieux de culture

Tableau 2

Tableau des milieux de culture utilisés

Culture	Source de carbone	Concentration en azote (mM atomes d'azote)	Age de la culture a) (jours)	Activité moyenne b) A593nm/A483nm // heure	Utilisation
NON INDUITE	Cellulose	33.3	12	< 0.01	Criblage de la génothèque
	Glucose	33.3	6-7	0.12 → 0.20	Purifications + Northern blots
	Extrait de malt	Extrait de malt	7	< 0.01 → 0.12	Northern blots
INDUITE	Glucose	2.58	13-20	0.30 → 0.50	Criblage de la génothèque + purifications + Northern blots

a) Age de la culture au moment de la préparation des mRNA

b) Activité ligninolytique moyenne de la culture telle que mesurée par la décoloration du poly B-411

induits. Il est à noter que nous avons aussi utilisé une culture non induite en extrait de malt pour faire certaines analyses. L'extrait de malt est un milieu riche en azote donc sans activité ligninolytique.

La mesure de l'activité ligninolytique, telle que rapportée au tableau 2, est donnée par unité fixe de volume du milieu de culture. Pour pouvoir comparer les mesures d'une culture à l'autre, il faut tenir compte de la masse cellulaire de ces cultures. Or la masse cellulaire des cultures non induites (glucose comme source de carbone ou extrait de malt) était au moment de l'extraction des mRNA de trois à quatre fois plus forte que la masse cellulaire des cultures induites, ce qui implique que la différence du niveau d'activité ligninolytique des cultures induites et non induites était de l'ordre de cinq à dix fois. Il était donc fort probable que les cultures induites contenaient de cinq à dix fois plus de mRNA spécifiques aux gènes recherchés (par unité de RNA total) que les cultures non induites. Les variations de masse cellulaire n'influençaient pas notre recherche des gènes exprimés de façon différentielle puisque nous utilisions des quantités fixes de RNA total.

A chaque fois que nous avons extrait le RNA d'une culture, nous utilisions le test au poly B-411 pour avoir une évaluation de l'activité ligninolytique de la culture. Il faut se rappeler cependant que ce test ne servait que

d'indicateur car il a déjà été établi dans la littérature par d'autres tests plus directs (Kirk et al., 1978; Evans et Palmer, 1983) que les conditions de culture que nous avons utilisées résultaient en des cultures avec et sans activité ligninolytique.

2- Criblage de la génothèque de *Trametes versicolor*

La taille exacte du génome de *Trametes versicolor* n'est pas connue. Cependant, la taille du génome des moisissures est peu variable [*Schizophyllum commune*: 3.5×10^7 bp (Dons et al., 1979), *Phanerochaete chrysosporium*: $4 - 5 \times 10^7$ bp (Raeder et Broda, 1984), *Neurospora crassa*: 3.4×10^7 bp (Dutta, 1974), *Coprinus lagopus*: 3.7×10^7 bp (Dutta, 1974)] et se situe aux alentours de 4×10^7 bp. Sachant que la génothèque que nous avons utilisée a été faite avec des fragments d'environ 10 Kb, nous avons besoin théoriquement d'environ 4 000 phages recombinants pour avoir une représentation presque totale du génome de *Trametes versicolor*.

Le criblage de la génothèque a été fait sur plus de 50 000 phages recombinants, soit l'équivalent de plus de dix copies du génome, et ce, sur un seul grand pétri de 22 cm par 22 cm. Nous y avons déposé successivement quatre filtres de nitrocellulose désignés A, B, C, D. Les filtres A et D ont été hybridés avec une sonde induite et les filtres B et C l'ont été avec une sonde non induite. Les sondes ont été

faites à l'aide de la transcriptase inverse sur des mRNA isolés de cultures induite (âgée de 20 jours ayant le glucose comme source de carbone et ayant une faible concentration en azote) et non induite (âgée de 12 jours ayant la cellulose comme source de carbone et ayant une forte concentration en azote). Puisque les sondes à la transcriptase inverse proviennent d'une réaction de synthèse, nous avons effectué celles-ci dans exactement les mêmes conditions et avons mis exactement la même quantité de radioactivité sur tous les filtres. De ce fait, nous mettions la même quantité de cDNA sur tous les filtres et pouvions donc déceler tout signal différentiel.

Nous présumons que la population de cDNA synthétisée représente assez fidèlement la complexité de la population initiale de mRNA. Nous savons par contre que la transcriptase inverse ne travaille pas aussi efficacement sur tous les types de mRNA mais celle-ci devrait travailler exactement de la même façon sur un type particulier de mRNA et proportionnellement à sa concentration. Donc si un gène hybride plus fortement avec la sonde induite, il est raisonnable de présumer que ce gène est plus fortement exprimé (mRNA plus abondant) dans la culture induite.

Après hybridation et exposition de 5 jours, nous avons obtenu le résultat montré à la figure 1 qui peut être exprimé

Figure 1

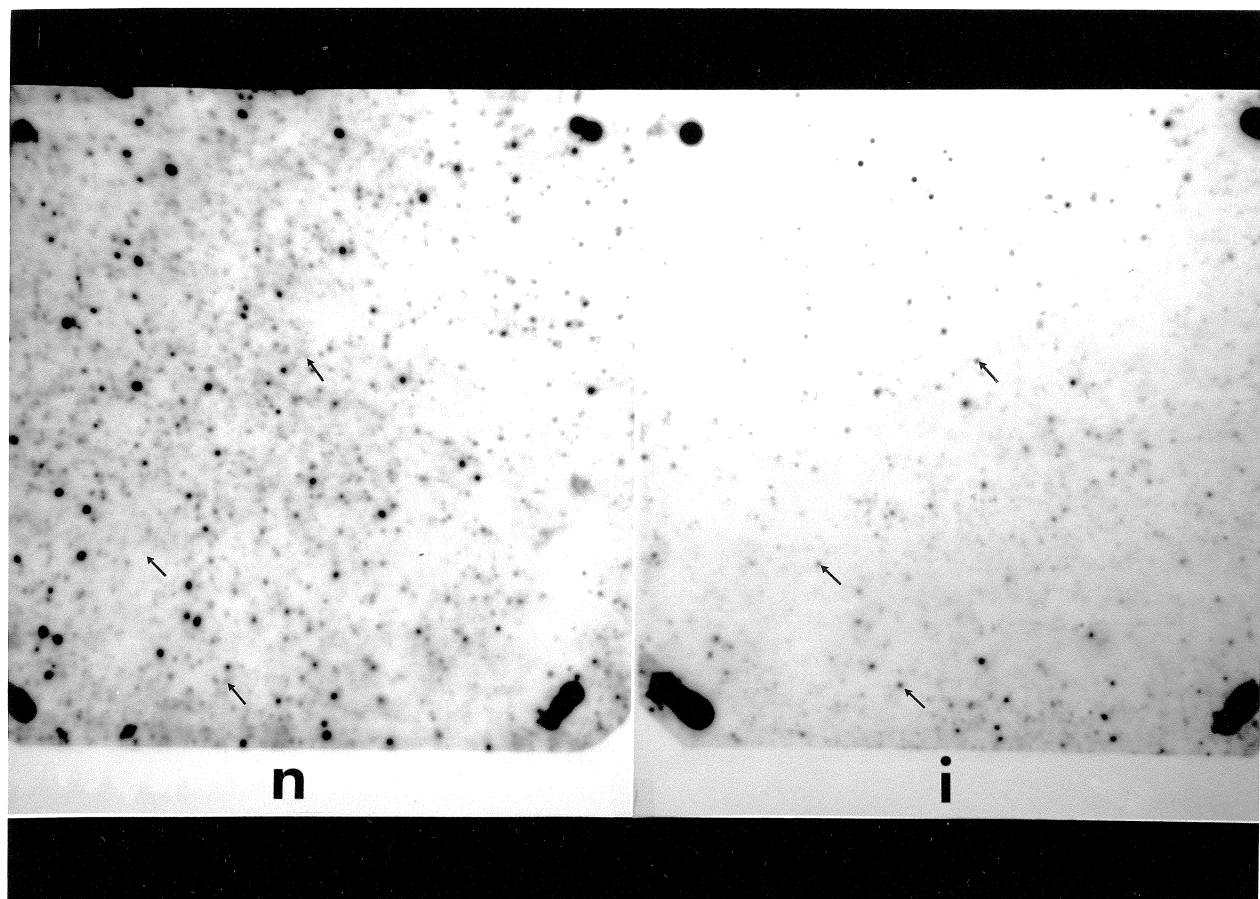
Hybridation de la g  noth  que de Trametes versicolor avec une sonde non induite (n) et une sonde induite (i)

Les flèches indiquent des exemples de signaux dont les plages correspondantes ont été repiquées.

Temps d'exposition: 5 jours

10×10^4 cpm/filtre

Figure 1



de la façon suivante. La proportion assez importante des clones qui hybridait avec l'une ou l'autre des différentes sondes est une mesure de la qualité de la gènothèque. La majorité des clones hybridait plus fortement avec la sonde non induite qu'avec la sonde induite. Par contre, certains clones hybridait également avec les deux sondes et quelques clones hybridait plus fortement avec la sonde induite qu'avec la sonde non induite (voir figure 1). Ce sont ces derniers qui nous intéressaient. Nous avons donc repiqué tous les clones (49) que nous avons pu identifier comme hybridant plus fortement avec la sonde induite qu'avec la sonde non induite. Pour certains de ces clones, la différence de signal était sans équivoque. Pour d'autres, la différence d'expression était beaucoup moins grande. Les clones que nous avons repiqués donnaient des signaux plus intenses sur les deux filtres hybridés avec la sonde induite que sur les filtres hybridés avec la sonde non induite.

3- Purification des clones

En pratique, lors du criblage de la gènothèque, nous avons repiqué une région qui correspondait à un signal. Cette région pouvait contenir plusieurs plages. Pour obtenir un clone homogène, nous avons effectué deux étapes de purification avec sonde en se servant des mêmes techniques de transfert et d'hybridation que celles utilisées pour cribler la gènothèque. Encore une fois, la quantité de radioactivité

par filtre était calculée avec la plus grande précision puisque c'était le contrôle que nous avions pour comparer l'expression de ces clones dans chacune des cultures.

Lors de la deuxième purification avec sonde, toutes les plages d'un même clone donnaient un signal équivalent avec une sonde donnée (c'est-à-dire un même signal plus intense avec la sonde induite qu'avec la sonde non induite) (voir figure 2). Pour s'assurer de l'homogénéité du clone, nous avons repiqué une plage isolée que nous avons remise sur pétri (environ 20 plages par pétri) et nous avons repiqué immédiatement une nouvelle plage isolée.

Lors des premières purifications, nous avons remarqué que le clone désigné 2 donnait un signal équivalent avec les deux sondes induite et non induite. Nous avons utilisé ce clone comme contrôle interne. Tout au cours des purifications et par la suite sur les "Northern blots", le clone 2 a toujours donné un signal équivalent avec les sondes et les mRNA provenant de cultures induites et non induites. Ceci nous a confirmé que les signaux différentiels obtenus étaient dus à la différence entre la représentation des mRNA dans les sondes induites et non induites et non pas à des variations dans la préparation des mRNA ou des sondes elles-mêmes.

Figure 2

Purification des clones

Chaque clone désigné par un chiffre a été hybridé avec
une sonde non induite (N) et une sonde induite (I).

Temps d'exposition: 5 jours

2×10^6 cpm/filtre

Figure 2

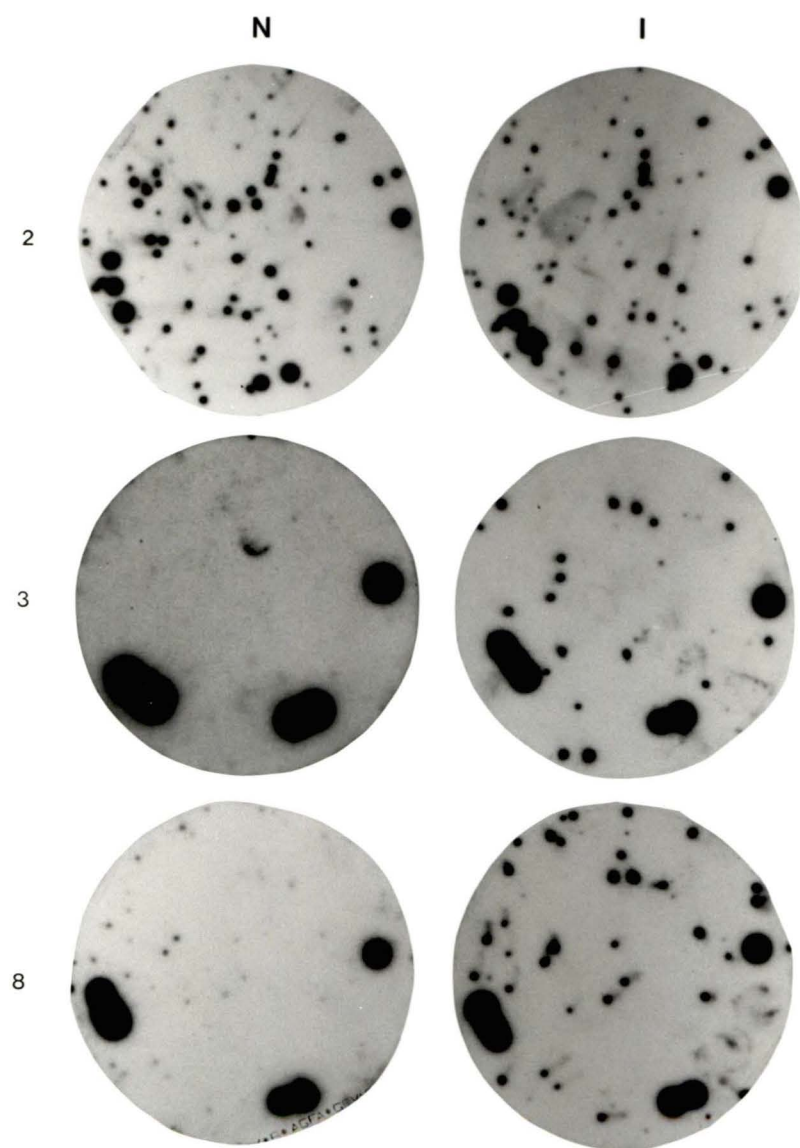


Figure 2 (suite)

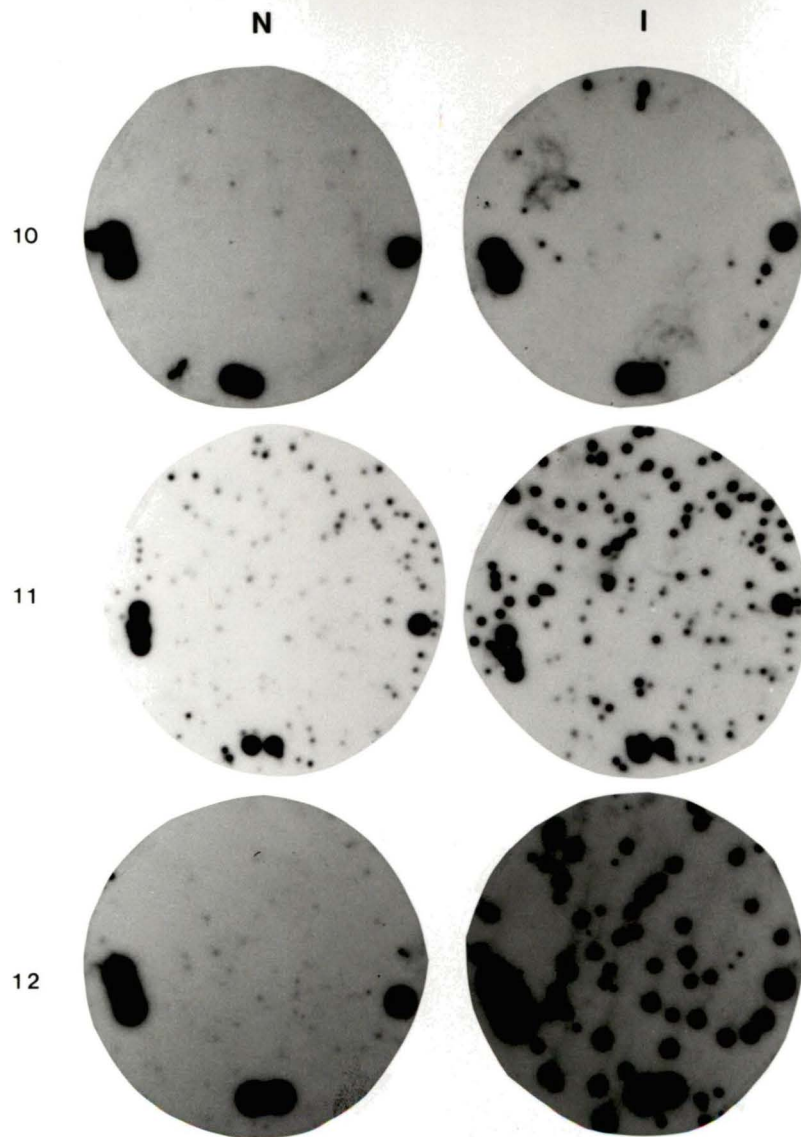


Figure 2 (suite)

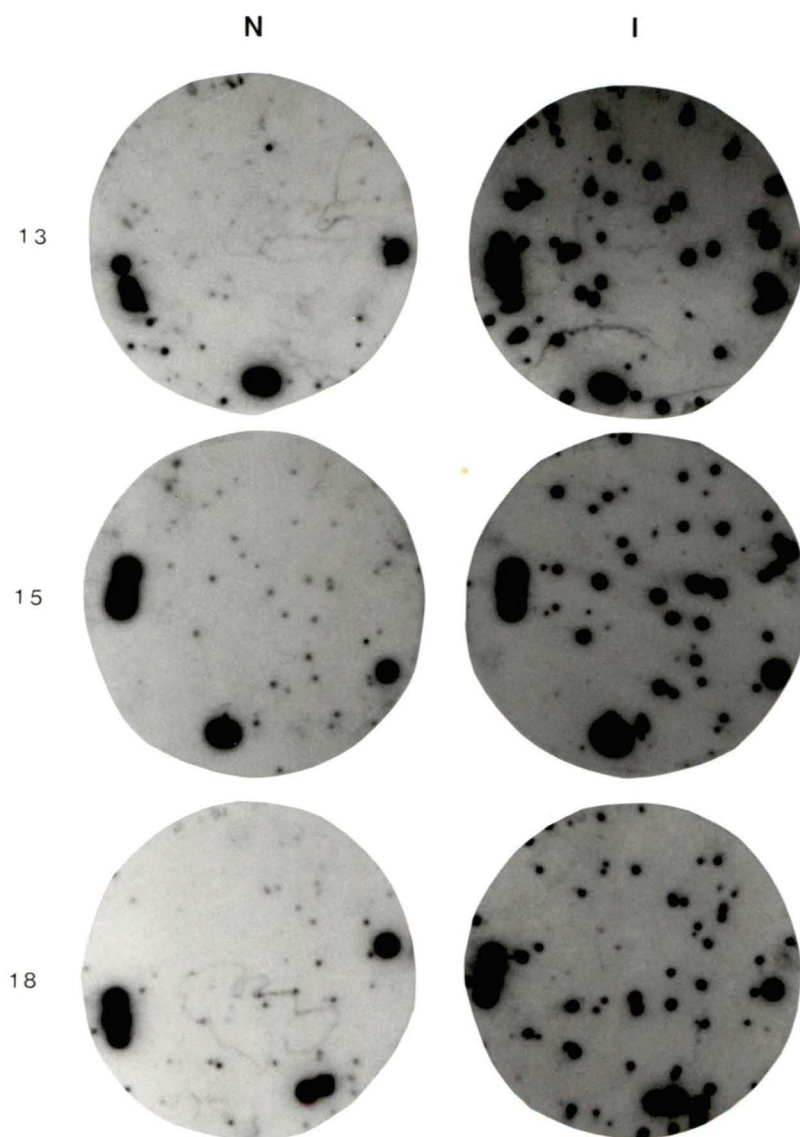


Figure 2 (suite)

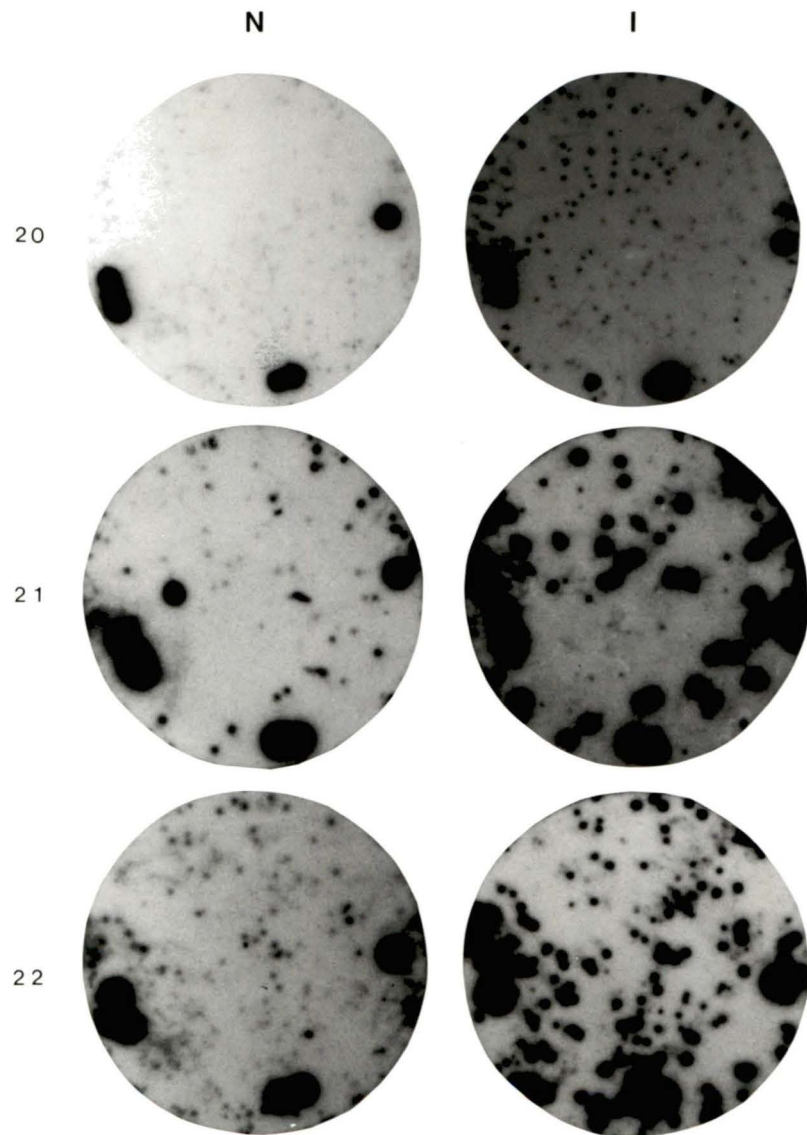


Figure 2 (suite)

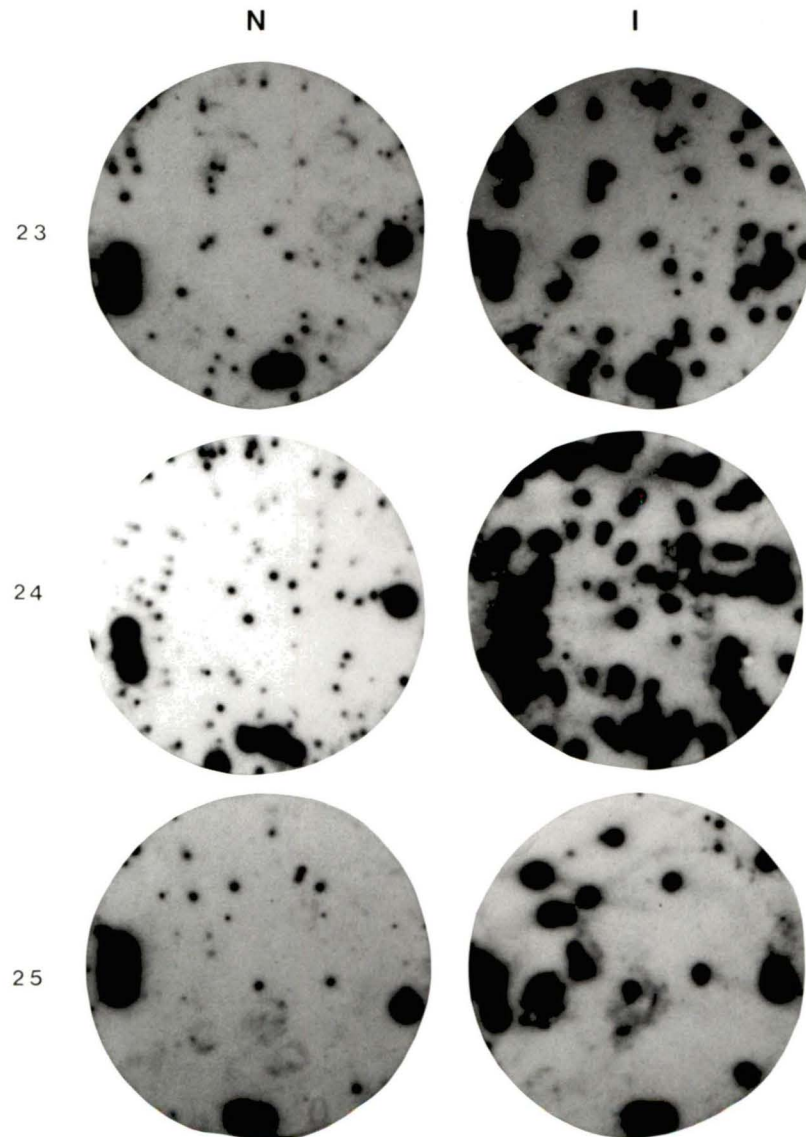


Figure 2 (suite)

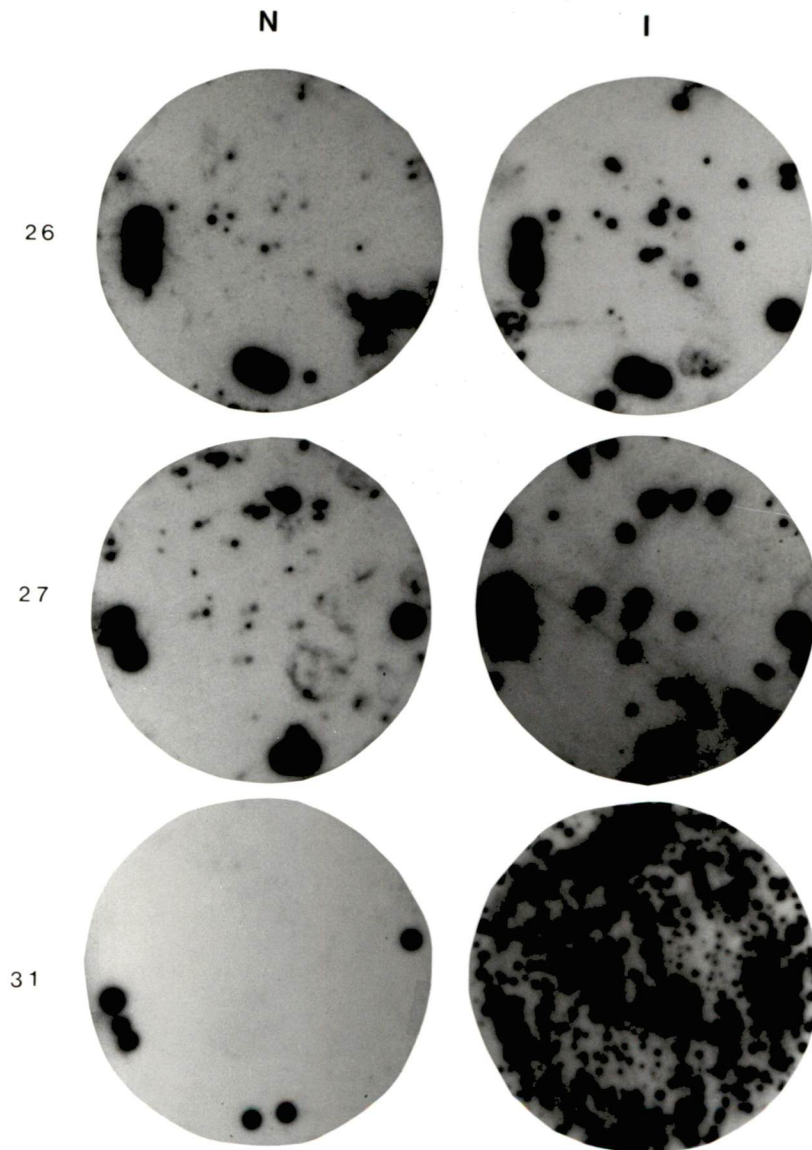
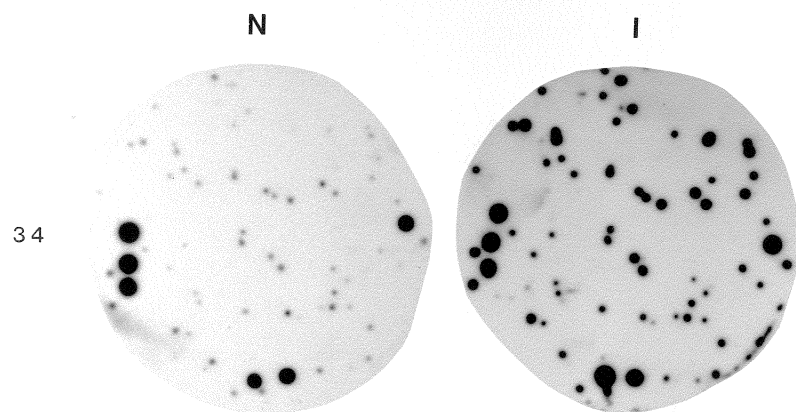


Figure 2 (suite)



A partir des 49 clones repiqués initialement de la gènothèque, nous sommes parvenue à en purifier 18 jusqu'à homogénéité du signal, soit les clones désignés 3 - 8 - 10 - 11 - 12 - 13 - 15 - 18 - 20 - 21 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 31 - 34 (voir figure 2). Pour ce qui est des autres clones, quelques uns ont donné des signaux équivalents avec les deux sondes lors des purifications (exemple: clone 2). Cependant, pour la grande majorité des autres clones, nous avons perdu le signal lors de la première purification. Il faut rappeler que lors du criblage de la gènothèque, nous avons repiqué toutes sortes de clones dont l'expression nous semblait différentielle, y compris ceux dont le signal passait de faible avec la sonde non induite à légèrement plus fort avec la sonde induite. Pour ces clones, il suffit que les conditions lors de la purification soient légèrement moins bonnes que lors du criblage de la gènothèque pour qu'il en résulte une perte du signal. Le corollaire de cette explication est que nous n'avons sans doute réussi à purifier que les clones dont l'expression différentielle était suffisamment marquée.

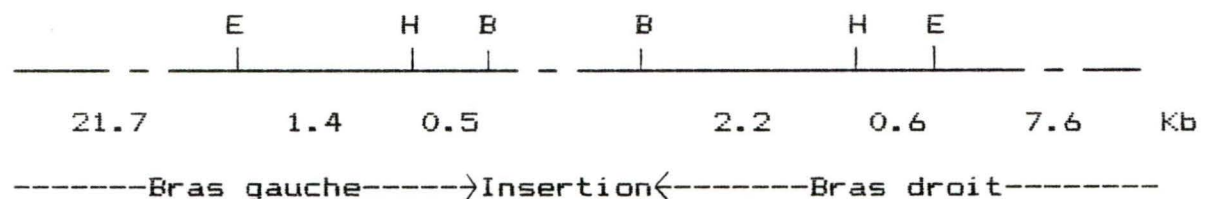
4- Cartographie des clones

Après amplification en milieu liquide du phage purifié et extraction du DNA, nous avons fait la carte des sites de restriction de chacun des clones par digestions simples et doubles avec les enzymes BamHI, SalI, EcoRI, HindIII. Pour

certains clones, nous avons de plus utilisé les enzymes KpnI et SstII.

Pour établir la carte de restriction du fragment cloné, il est utile de se rappeler que la génothèque a été constituée par clonage des fragments obtenus d'une digestion partielle par l'enzyme Sau3a au site BamHI du phage λ L47.1. De ce fait, les sites BamHI ne sont pas reconstitués dans tous les cas. Cependant, des sites HindIII et EcoRI sont présents à proximité des sites BamHI dans chacun des bras droit et gauche du phage, permettant ainsi de délimiter l'insertion avec précision (voir ci-dessous).

Carte du phage λ L47.1



A la figure 3, à titre d'exemple, nous présentons la photo du gel qui a servi à déterminer la carte de restriction du clone 31. Dans la piste 2 (digestion par HindIII), nous voyons 5 bandes. Les deux bandes du haut correspondent respectivement au bras gauche et au bras droit du phage liés par les extrémités Cos et au bras gauche du phage seul.

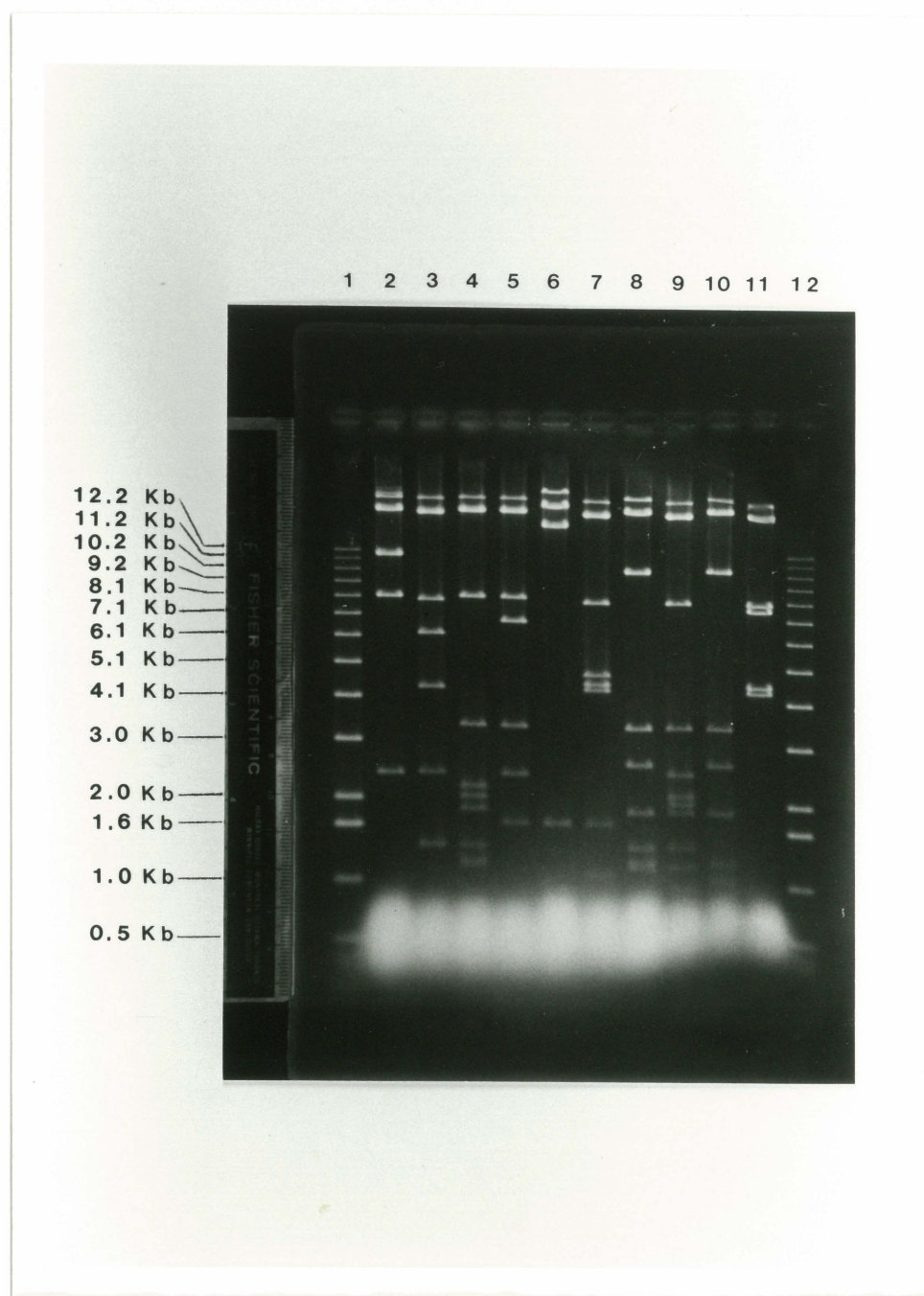
Le bras droit seul, lui, correspond à la bande de 8.2 Kb. Il ne reste donc que 2 bandes HindIII (2.4 Kb et 11.7

Figure 3

Photographie du gel qui a servi à déterminer la carte de restriction du clone 31

Dans les pistes 1 et 12, il y a des marqueurs de poids moléculaire dont la taille est indiquée à gauche. Dans les pistes 2 à 11, le DNA du clone 31 a été traité respectivement par les enzymes de restriction suivants: HindIII, HindIII + EcoRI, HindIII + SalI, HindIII + BamHI, BamHI, BamHI + EcoRI, SalI, SalI + EcoRI, SalI + BamHI, EcoRI.

Figure 3



Kb), ce qui implique que l'insertion du clone 31 ne contient qu'un seul site HindIII. Maintenant, considérons la digestion par BamHI (piste 6). On dénote la présence de 4 bandes dont la plus élevée représente les bras liés et les deux suivantes respectivement les bras gauche et droit avec tous deux l'addition d'un fragment de l'insertion. De ce fait, on peut déduire que les sites de clonage BamHI n'ont pas été reconstitués. Par contre, nous avons un fragment de 1.6 Kb qui indique la présence dans l'insertion de deux sites BamHI délimitant ce fragment. Maintenant, passons à la double digestion HindIII + BamHI (piste 5). On constate qu'on retrouve intact le petit fragment HindIII (2.4 Kb). Cependant, le fragment HindIII de 11.7 Kb est scindé en fragments de 6.7 Kb, 3.4 Kb et 1.6 Kb, ce dernier représentant le fragment de 1.6 Kb déjà observé dans la piste de digestion BamHI (piste 6). On peut donc en déduire que c'est le fragment HindIII de 11.7 Kb qui contient les 2 sites BamHI présents dans l'insertion, à une distance de 3.4 Kb et 6.7 Kb de sites HindIII. En poursuivant de cette façon l'analyse, on parvient à situer tous les sites de restriction les uns par rapport aux autres. A la figure 4, nous présentons l'ensemble des cartes de restriction établies de la façon décrite ci-dessus pour l'ensemble des clones que nous avons isolés.

Figure 4 (a et b)

Cartes de restriction des clones d'expression différentielle isolés de la génothèque de Trametes versicolor

Le numéro du clone est indiqué à gauche. Pour chacun des clones, seule l'insertion a été représentée. Les rectangles indiquent le fragment du clone qui contient le gène induit. Les lettres B, S, H, E représentent respectivement les sites de coupure des enzymes BamHI, SalI, HindIII, EcoRI.

Les clones qui ont des séquences communes ont été regroupés dans la figure 4a.

Les sites SalI du clone 24 n'ont pas tous été positionnés.

Figure 4a

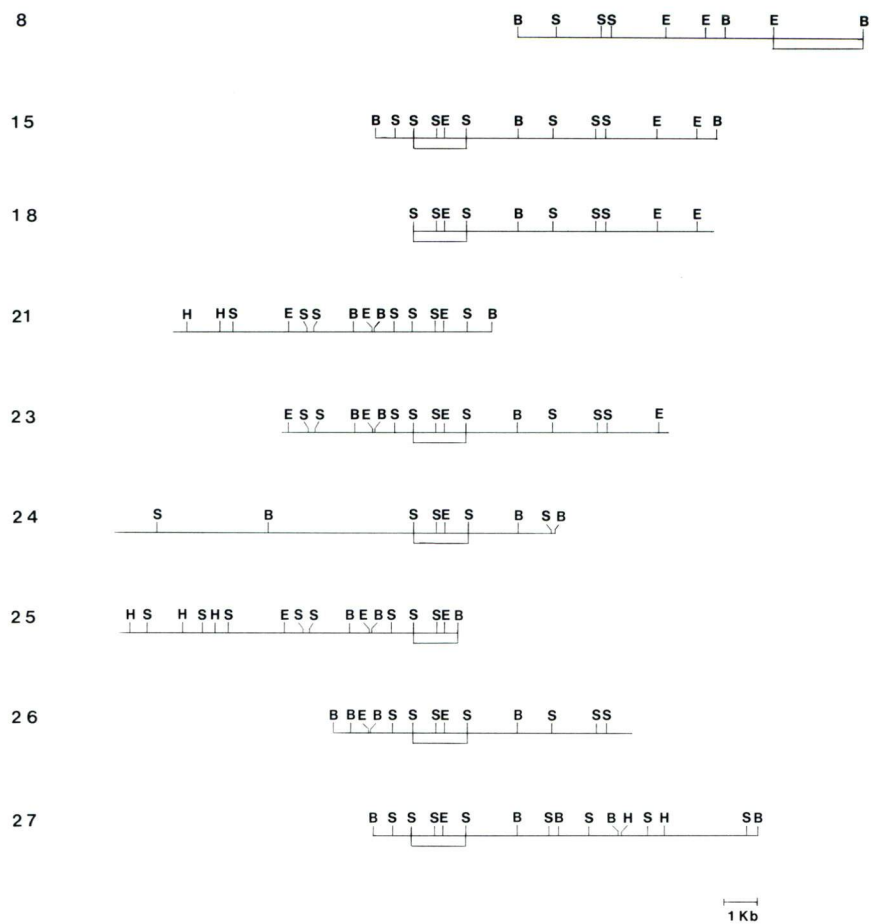
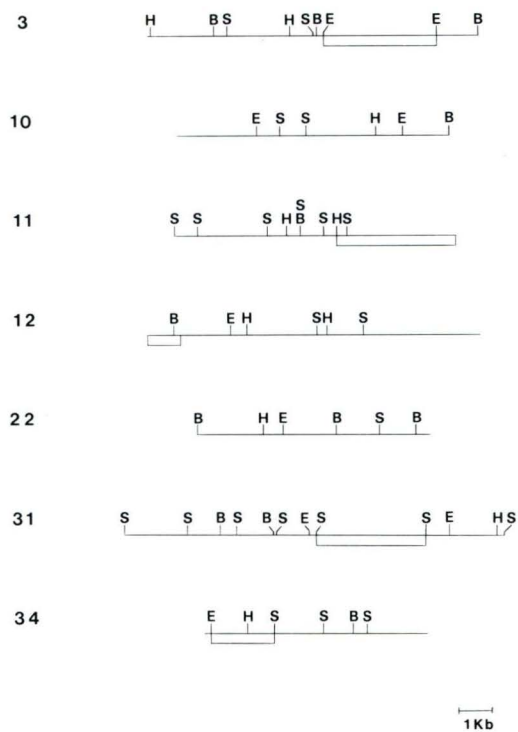


Figure 4b



La comparaison des cartes de restriction des clones présentées à la figure 4 (a et b) a permis de constater entre autres que les insertions présentes dans les clones 3 et 20 étaient parfaitement identiques (identifiés seulement comme le clone 3 dans la figure 4b). Il en était de même pour les clones 13 et 18 (identifiés seulement comme le clone 18 dans la figure 4a). Les insertions des clones 15, 18, 21, 23, 24, 25, 26 et 27 se recoupaient et partageaient toutes une région commune. Si on regarde de plus près la carte de ces derniers clones, on voit une correspondance des sites dans la plupart des cas (15, 18, 21, 23, 25, 26), ce qui correspond en fait à la structure génomique (Pierre Trudel, communication personnelle). Cependant, pour les clones 24 et 27, on voit qu'il y a eu réarrangement du DNA durant le clonage, c'est-à-dire qu'un fragment de DNA non contigu dans le génome s'est lié au bout de DNA commun à cette série. L'insertion du clone 8 partageait une région avec les clones 15, 18, 23 et 26 mais ne contenait pas la région commune ci-haut mentionnée.

Pour confirmer que certains clones partageaient des séquences communes, nous avons utilisé l'insertion présente dans le clone 15 comme sonde que nous avons hybridée avec le DNA des autres clones. De plus, nous avons inclu dans cette analyse les clones 3 et 31 comme témoins négatifs puisque ceux-ci ne présentaient pas de similarité avec le clone 15 au

niveau de la carte de restriction. La sonde utilisée était le fragment HindIII du clone 15 contenant toute l'insertion plus une petite partie des bras gauche et droit du phage. De ce fait, tous les clones y compris les témoins négatifs devraient présenter une hybridation au niveau des bras du phage. Le résultat de cette hybridation (figure 5) confirme qu'il existe bel et bien des séquences communes telles que déduites par les cartes de restriction de la figure 4. Pour les clones 3 et 31 (témoins négatifs), seuls les bras du phage hybrident avec la sonde 15. Cependant, pour tous les autres clones, on observe une hybridation avec des bandes autres que celles des bras. De plus, ces bandes correspondent aux séquences communes déduites par les cartes de restriction.

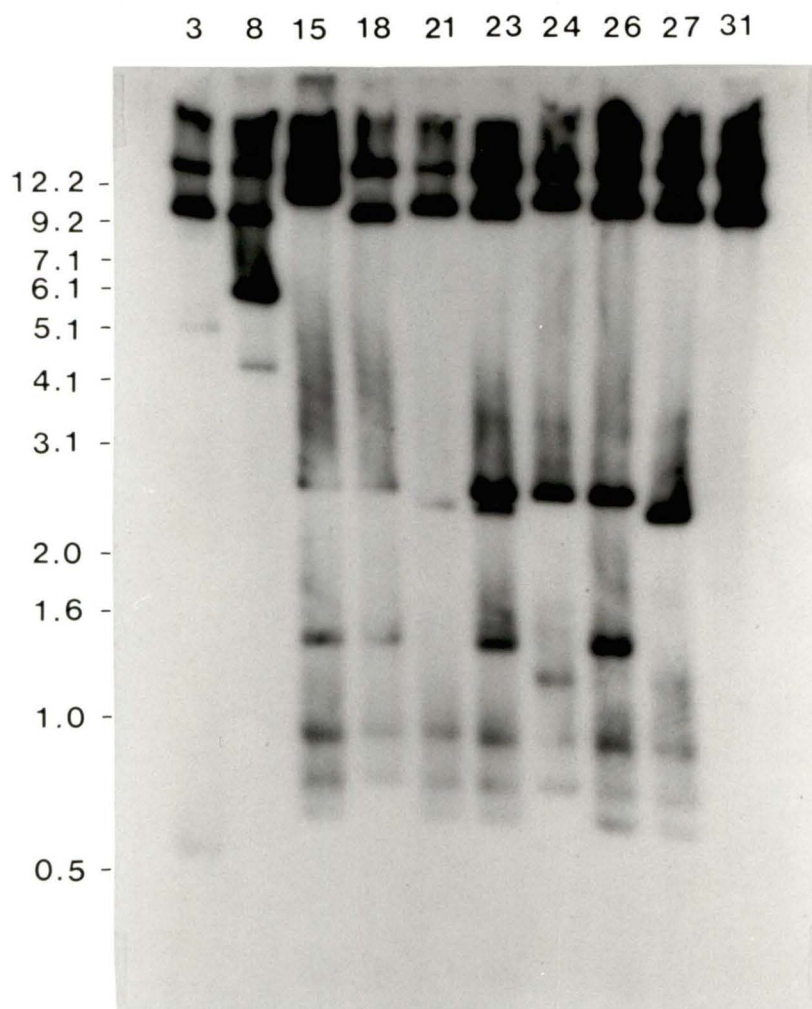
Donc nous pouvons conclure que dans certains cas, nous avons isolé la même insertion (à deux reprises) et que de plus, nous avons isolé une série d'insertions se chevauchant les unes, les autres. Ceci est une très bonne indication que notre stratégie d'identification de clones exprimés de façon différentielle était de fait spécifique. Ce résultat correspond également à notre attente puisque notre criblage de départ a été effectué sur 50 000 plages, soit plus de dix génomes équivalents de Trametes versicolor. Il est donc normal qu'un criblage qui se voulait exhaustif, s'il est spécifique, mène à l'isolement répété de mêmes clones. Enfin,

Figure 5

Hybridation du DNA du clone 15 avec le DNA de différents clones

Le numéro du clone est indiqué en haut de chacune des pistes. Les clones 3 et 8 ont été digérés par l'enzyme BamHI alors que tous les autres clones l'ont été par SalI. A la gauche est inscrite la taille de certains fragments du marqueur de poids moléculaire utilisé (en kilo paires de bases).

Figure 5



notons que le fait d'avoir isolé une série de clones différents partageant une région commune est une indication en faveur de la bonne représentativité du génome de Trametes versicolor dans la génothèque.

5- Cartographie des séquences induites

Afin de préciser les coordonnées de la région induite, nous avons utilisé les gels qui ont servi à faire la carte de restriction des différents clones. Après transfert du DNA sur nitrocellulose, nous avons hybridé avec une sonde induite obtenue de l'action de la transcriptase inverse sur des mRNA provenant d'une culture induite. Dans ces conditions, seuls certains fragments de l'insertion ont été illuminés permettant de déduire la position de la région contenant le gène induit.

Comme on peut le constater (figure 4a), les clones 15, 18, 23, 24, 25, 26 et 27 partagent la même région induite. Nous n'avons pas fait cette étude sur le clone 21 mais selon toute probabilité, elle aurait donné le même résultat. La partie induite du clone 8 n'est pas la même que celle des autres clones de cette série puisque le clone 8 ne contient pas la région commune à ces clones. Pour tous les clones analysés, nous sommes parvenue à ne délimiter qu'une seule région induite.

6- Analyse des mRNA des gènes induits

Pour avoir la preuve ultime que les clones isolés avaient effectivement une expression différentielle, il fallait faire un "Northern blot". C'est le moyen le plus direct pour évaluer l'expression d'un gène en évitant tout risque d'artéfact causé par des facteurs externes (exemple: artéfact possiblement causé par les sondes à la transcriptase inverse). Si on veut comparer l'intensité des signaux obtenus sur "Northern blot", il faut s'assurer au départ de mettre la même quantité de mRNA dans chacune des pistes induites et non induites. Pour ce faire, nous avons resuspendu les mRNA (après un passage sur colonne d'oligo dT-cellulose) dans un volume minimal d'eau (20 -40 μ l). Pour évaluer la concentration relative des mRNA de chacune des préparations, nous avons fait une dilution dans l'eau (2:20) de nos RNA et nous avons mis 1-2-4-8 μ l de cette dilution sur un même gel. Après une courte migration (exemple: Baby gel BRL 80 volts 10 min.) et coloration au EtBr, nous avons pris la photo du gel et avons pu comparer la concentration en mRNA de chacune des préparations.

Après évaluation de la concentration des mRNA, nous avons pu faire le gel dénaturant. Nous avons utilisé deux types de gels dénaturants: 1) au glyoxal 2) à la formaldéhyde. A la figure 6, nous avons les photos de certains gels qui ont servi à faire des "Northern blots" et à la figure 7 sont

Figure 6 (a et b)

Photographie des gels qui ont servi à faire des "Northern blots"

Les gels 1 et 2 sont des gels dénaturants au glyoxal alors que les autres gels sont des gels dénaturants à la formaldéhyde. La provenance du RNA est indiquée par la lettre N (culture non induite) ou I (culture induite). La lettre M indique un marqueur de poids moléculaire (27S et 18S). En général, les RNA ribosomiaux de la moisissure (25S, 17S, 5.8S) servaient de marqueurs de poids moléculaire.

Figure 6a

Le gel 1 a servi à faire le "Northern blot" sur lequel le DNA du clone 26 a été utilisé comme sonde alors que le gel 2 a été utilisé pour faire le "Northern blot" du clone 22 (figure 7b).

Le gel 3 a servi à faire les "Northern blots" des clones 31 et 34 alors que le gel 4 a servi à faire ceux des clones 2 et 11 (figure 7c).

Figure 6b

Le gel 5 a servi à faire les "Northern blots" des clones 2, 3, 15 et 22 (figure 7d). Le gel 6 a servi à faire les "Northern blots" des clones 21 et 25 alors que le gel 7 a servi à faire ceux des clones 2, 8 et 11 (figure 7e).

Figure 6a

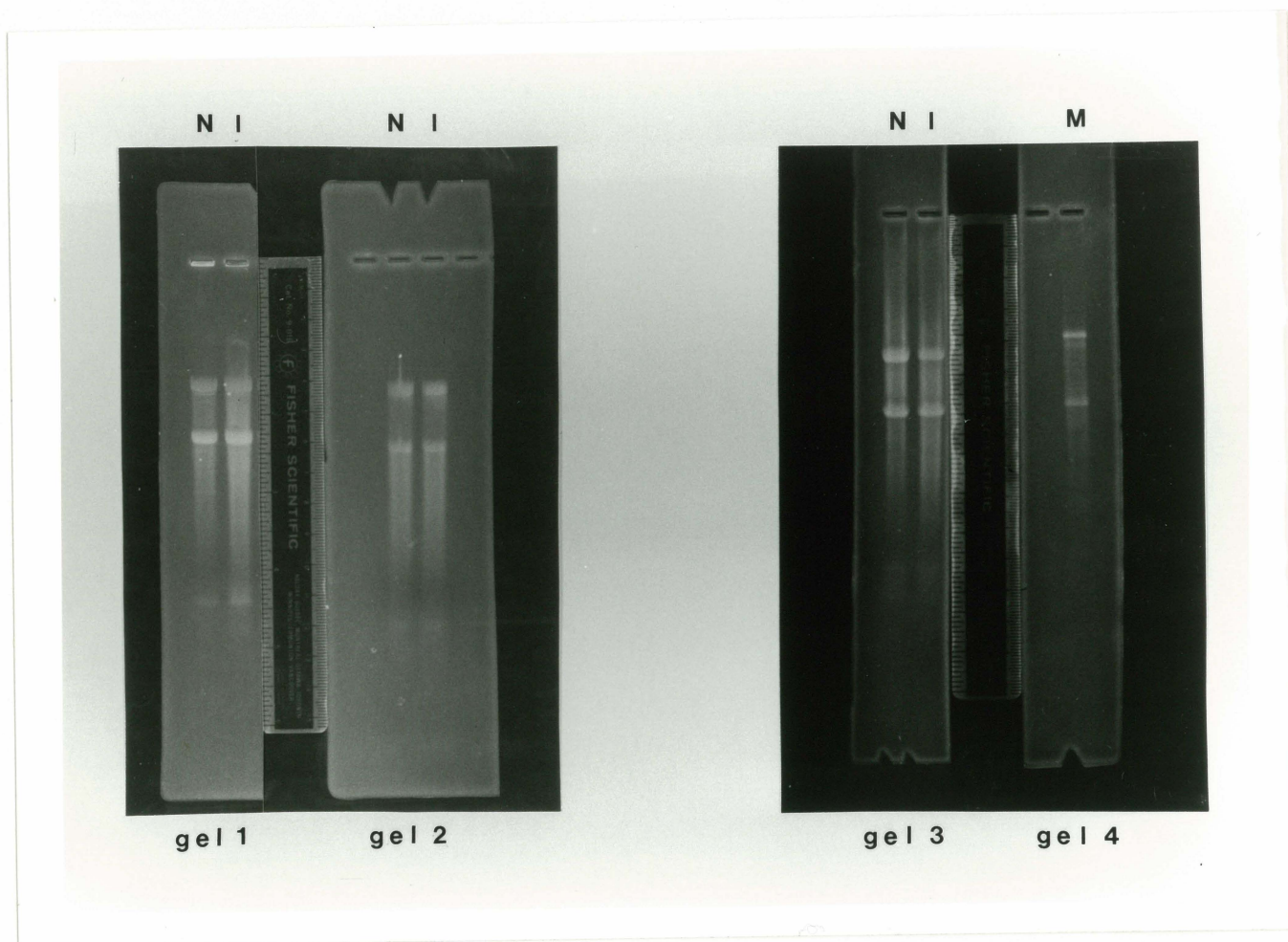


Figure 6b

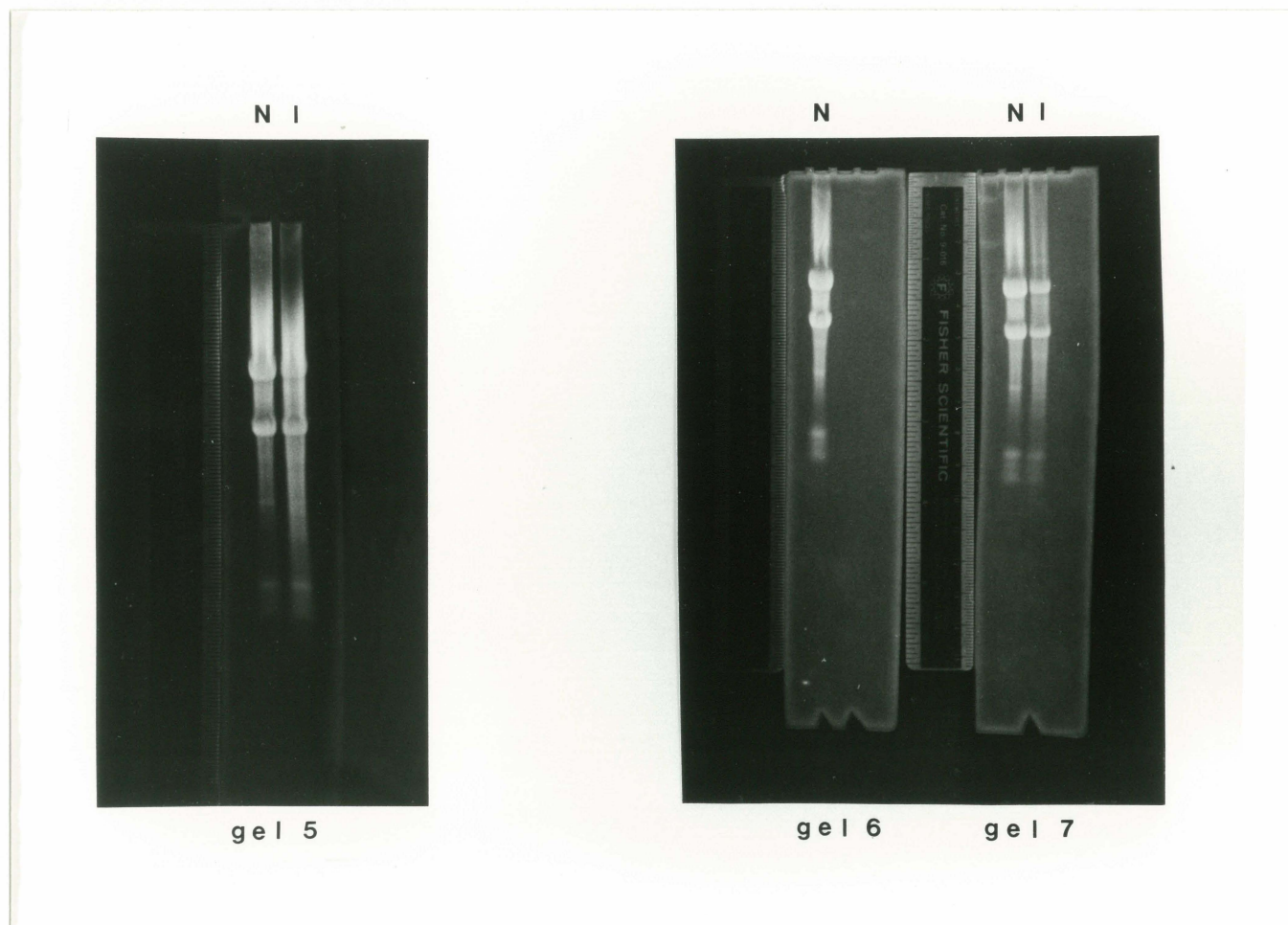


Figure 7

Autoradiogrammes des "Northern blots"

La provenance du RNA présent dans chacune des pistes est indiquée par la lettre N (culture non induite) ou I (culture induite). La taille et la position des marqueurs de poids moléculaire sont indiquées à gauche. Le numéro du clone dont le DNA a été utilisé comme sonde est indiqué au bas de la figure.

Figure 7 (a et b)

Des gels dénaturants au glyoxal ont été utilisés pour faire ces "Northern blots".

Figure 7c

Des gels dénaturants à la formaldéhyde (sans traitement au NaOH) ont été utilisés pour faire ces "Northern blots".

Figure 7 (d et e)

Des gels dénaturants à la formaldéhyde (avec traitement au NaOH) ont été utilisés pour faire ces "Northern blots".

15a et 15b représentent le même "Northern blot" avec des temps d'exposition différents.

Figure 7a

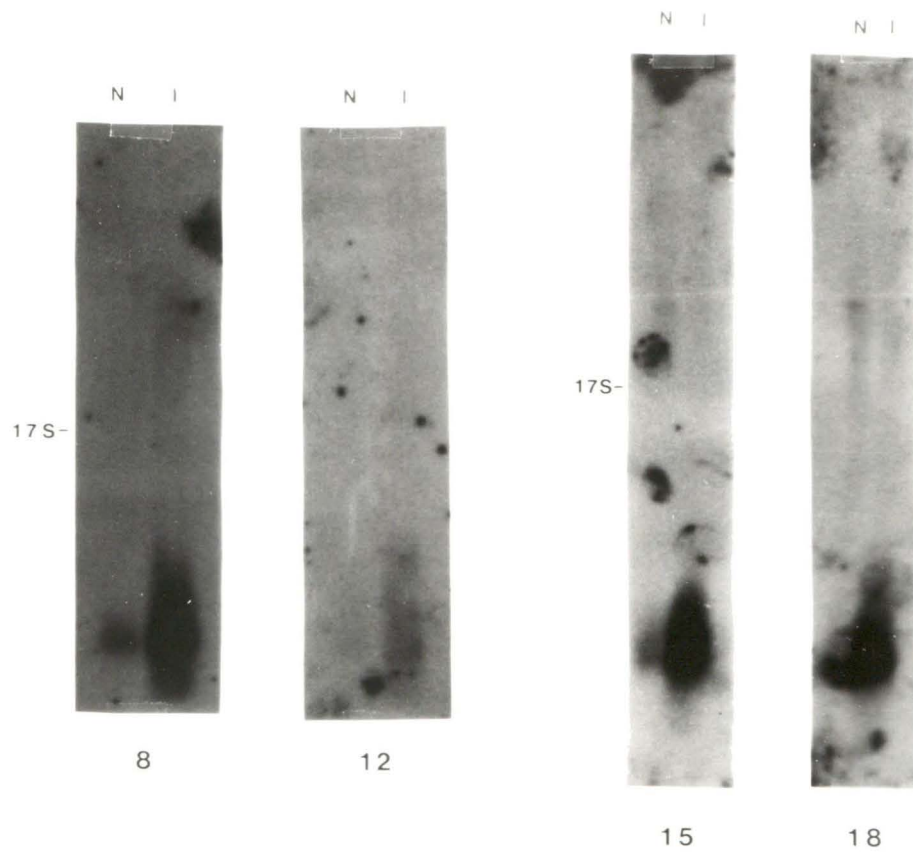


Figure 7b

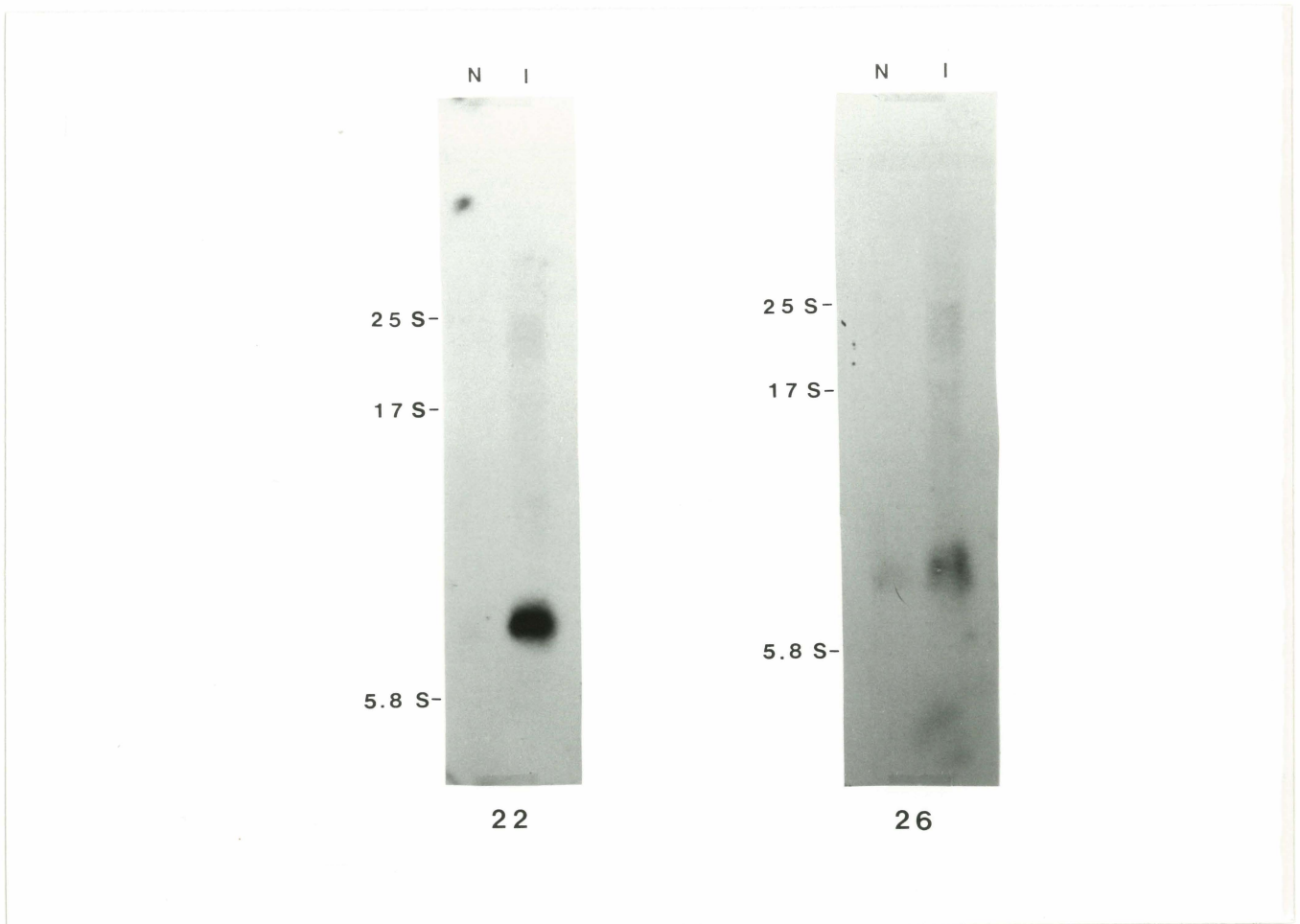


Figure 7c

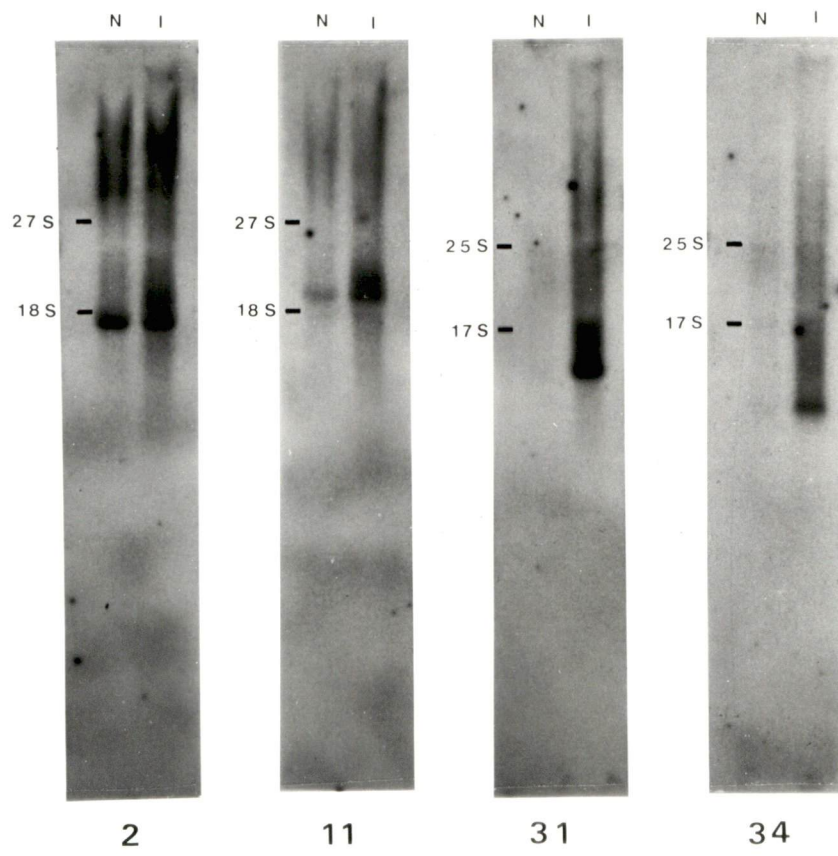


Figure 7d

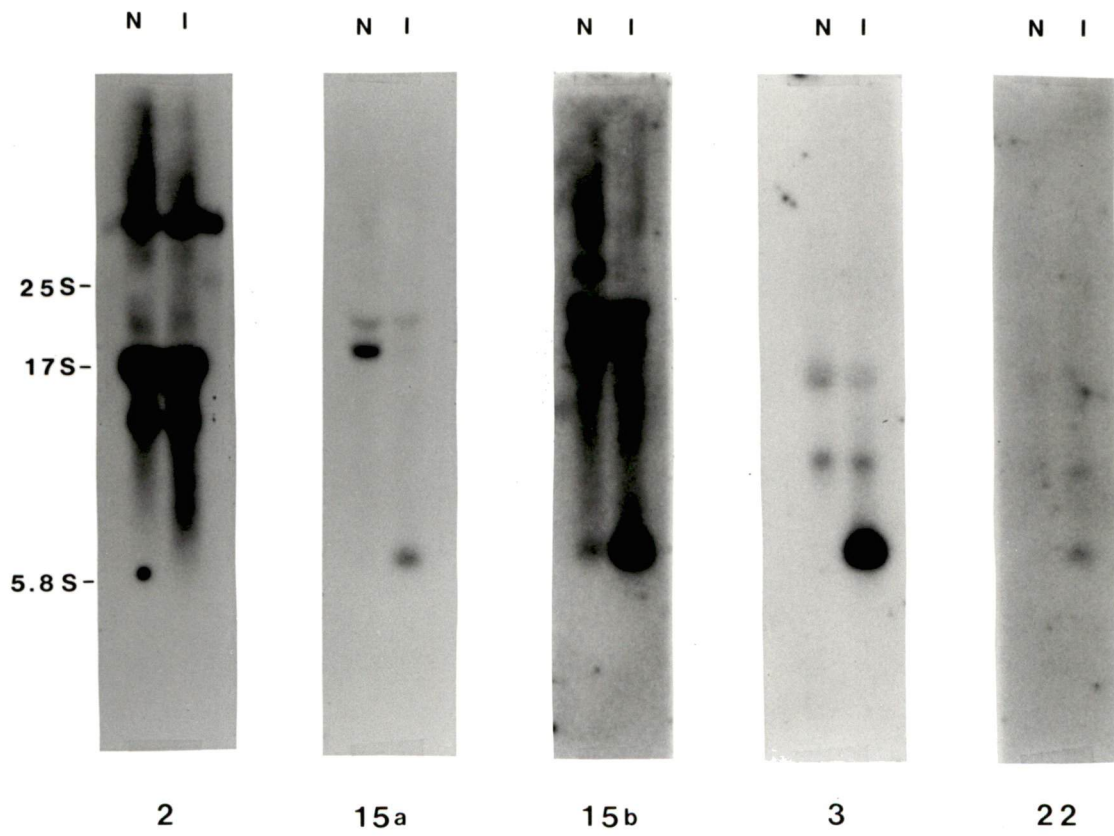
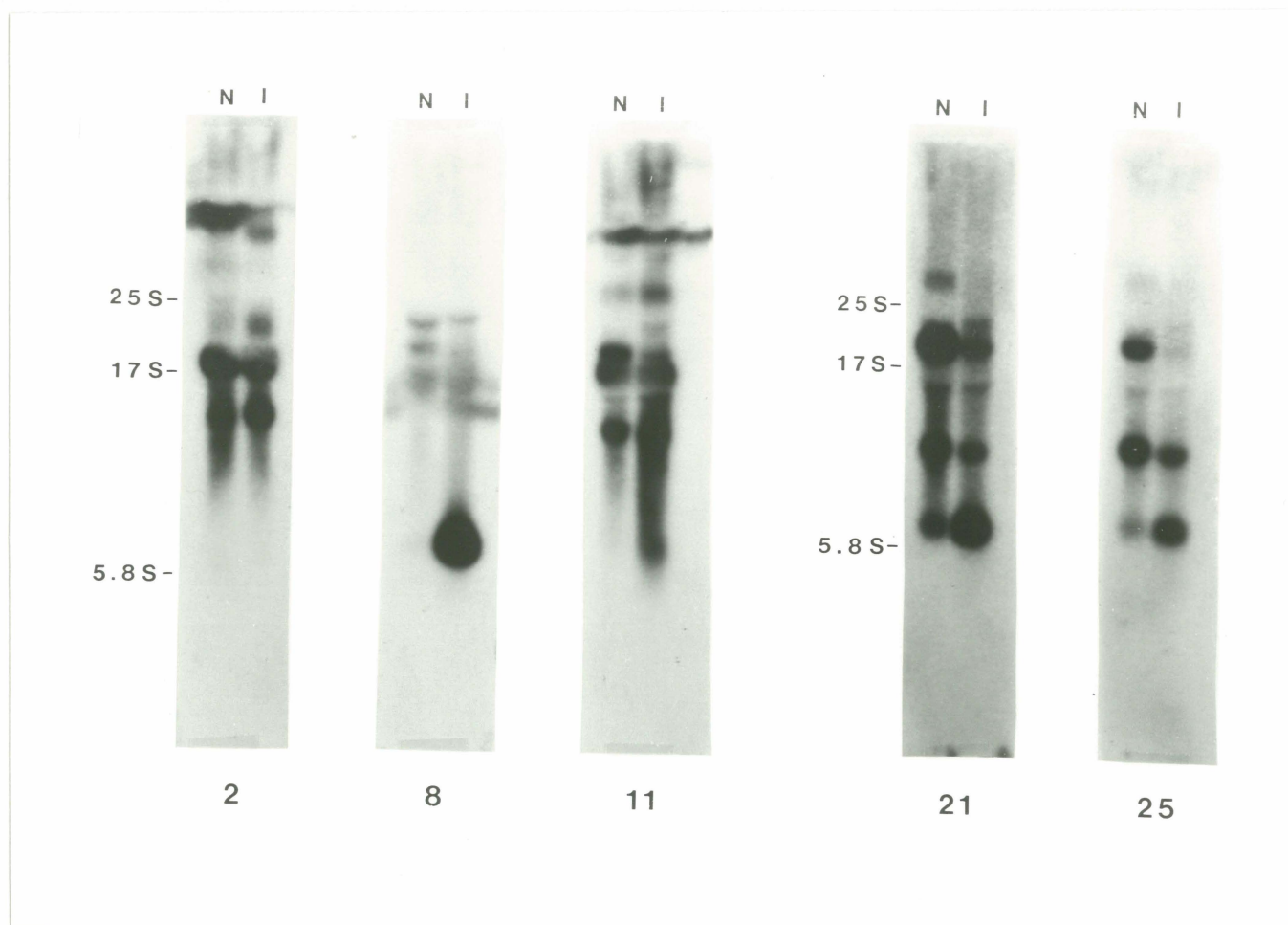


Figure 7e



les résultats des hybridations. Les marqueurs de poids moléculaire sont les RNA ribosomiaux.

Avec des gels au glyoxal, nous n'avons pas réussi à obtenir une très bonne résolution mais malgré cela, nous avons pu observer tel qu'attendu un signal différentiel pour les clones 3, 8, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 24 et 26 (exemples en figures 7a et 7b). Seul le clone 10 n'a donné aucun signal (aucune expression visible dans les pistes induites et non induites).

Pour améliorer la résolution et la sensibilité de nos "Northern blots", nous avons effectué des gels dénaturants à la formaldéhyde sans traitement au NaOH (voir matériel et méthodes). Nous avons alors obtenu une image d'expression différentielle pour les clones 11, 31 et 34 (figure 7c), le clone 2 servant de contrôle interne. Les images obtenues sur "Northern blots" ont confirmé que chacun des clones ne contenait qu'un seul messenger induit.

Jusqu'à ce point, nous avons fait des "Northern blots" avec des préparations de mRNA provenant de cultures non induites à base de glucose contenant une concentration élevée en azote et de cultures induites à base de glucose contenant une faible concentration en azote. Cependant, on avait observé que la moisissure avait plus de difficulté à croître en milieu synthétique qu'en milieu riche comme, par exemple, en extrait de malt. Etant donné qu'une culture qui se

développe en extrait de malt a peu d'activité ligninolytique (voir tableau 2), nous avons voulu refaire des "Northern blots" pour certains clones en utilisant cette fois une culture non induite faite à partir d'extrait de malt. Les RNA induits étaient toujours extraits de cultures à base de glucose ayant une faible concentration en azote. Nous avons fait des gels dénaturants à la formaldéhyde que nous avons traités au NaOH pour améliorer le transfert (voir matériel et méthodes). Les photos de ces gels sont en figure 6b et les clones 2, 3, 8, 10, 11, 12, 15, 21, 22, 25, 31, 34 ont été utilisés comme sonde sur ces nouveaux RNA non induits. Les résultats de ces hybridations (résultats non montrés pour les clones 10, 12, 31, 34) sont aux figures 7d et 7e.

Le clone 2 sert toujours de contrôle interne. Cependant, si on compare ce résultat avec celui montré à la figure 7c, on voit qu'il y a apparition de bandes supplémentaires dans les pistes induites et non induites, ce qui est d'ailleurs le cas pour la majorité des clones analysés. Dans la plupart des cas, le messenger qui était induit dans un milieu à base de glucose ayant une faible concentration en azote n'était pas exprimé quand la culture a poussé en extrait de malt et demeurait toujours induit dans le milieu faible en azote (exemples: 3, 8, 15, 21, 25). Pour certains cas particuliers (11, 31, 34), il semble que le messenger qui était induit dans un milieu faible en azote est

aussi exprimé en extrait de malt. Il se peut cependant qu'il s'agisse d'un autre messenger de poids moléculaire équivalent qui est maintenant exprimé en extrait de malt. Puisque dans beaucoup de cas on voit l'apparition de nouveaux messagers dans les cultures induites et/ou non induites, la probabilité existe que 2 messagers différents de poids moléculaire semblable soient codés par l'insertion du clone. Pour certains RNA qui apparaissent maintenant sur ces "Northern blots", il est possible que leur détection ne soit due qu'à une augmentation de la sensibilité de notre méthode d'analyse suite à un meilleur transfert des mRNA grâce au traitement au NaOH du gel. Cependant, pour d'autres mRNA, particulièrement ceux qui sont fortement exprimés, l'explication la plus plausible serait que l'insertion de chacun des clones est un bout de DNA qui est très activement transcrit. La transcription de la majorité des gènes qui y sont codés est indépendante de la concentration en azote du milieu de culture. L'expression de ces gènes dépend d'autres paramètres de culture, c'est ce qui explique la variabilité de leur présence d'une culture à l'autre. Cependant, ces gènes n'étaient sûrement pas exprimés dans la culture non induite qui a servi à isoler ces clones car autrement, nous n'aurions pu détecter ces clones particuliers.

Pour ce qui est des clones 10 et 12 (résultats non montrés), nous n'avons pas réussi à obtenir une image sur "Northern blot". Comme nous avons pu isoler et purifier ces

clones mais que nous n'avons obtenu aucun signal sur "Northern blot", ceci laisse croire que la technique utilisée pour purifier ces clones est plus sensible et donc plus puissante que la méthode utilisée pour faire les "Northern blots".

Suite aux résultats rapportés ci-haut, nous voyons que la méthode que nous avons utilisée pour aller chercher des gènes exprimés de façon différentielle est très spécifique et permet d'isoler des gènes induits dans certaines conditions de culture. Cependant, cette méthode n'est pas infaillible puisque nous pourrions vraisemblablement avoir obtenu quelques faux positifs (11, 31, 34) en ce sens que ces gènes pourraient ne pas être induits par le manque d'azote et que leur expression dépendrait d'autres paramètres de culture. Si tout le DNA de Trametes versicolor est aussi activement transcrit que les insertions que nous avons purifiées, il est probable que nous ayons passé à côté de certains gènes exprimés de façon différentielle qui étaient à proximité de gènes fortement exprimés dans la culture non induite.

7- Sommaire de l'analyse des clones

En résumé, sur les 49 candidats de départ, 18 ont pu être purifiés, 16/18 contiennent une insertion non identique et 8/16 ont une certaine homologie de séquence dans une région dite induite. Le clone 8 étant différent de ceux de

la série homologue au clone 15, il semble que nous ayons purifié 9 séquences de DNA différentes d'après leur patron de restriction et l'image qu'ils donnent sur "Northern blot". Pour la majorité de ces clones, nous avons pu mettre en évidence une image d'expression différentielle sur "Northern blot".

DISCUSSION

Nous avons utilisé une méthode simple d'hybridation différentielle pour isoler des gènes qui étaient exprimés de façon préférentielle dans certaines conditions de culture chez Trametes versicolor. D'autres groupes ont utilisé le même type d'hybridation pour isoler des gènes induits lors de la sporulation chez Saccharomyces cerevisiae (Clancy et al., 1983; Percival-Smith et Segall, 1984), des gènes induits durant le développement chez Aspergillus nidulans (Zimmermann et al., 1980), des gènes induits par le galactose chez Saccharomyces cerevisiae (St-John et Davis, 1979). Dans chacun des cas, l'organisme utilisé avait un génome relativement petit, de taille probablement comparable à celui de Trametes versicolor. Cependant, la méthode que nous avons utilisée demeurerait la plus simple puisque nous avons fait une hybridation différentielle directement sur la génothèque, sans aucun enrichissement de la sonde et sans augmentation de la taille des plages pour obtenir un signal plus intense. De fait, pour augmenter l'intensité du signal lors de l'hybridation, et ce, en raison de la complexité de la sonde, plusieurs ont utilisé la formation de plages plus grandes pour parvenir à détecter des gènes d'expression moindre (St-John et Davis, 1979; Clancy et al., 1983). De plus, pour diminuer la complexité de la sonde, le groupe de Timberlake (Zimmermann et al., 1980) a éliminé les séquences communes à deux conditions de culture différentes avant d'utiliser la

sonde.

Chez les champignons, on peut diviser en trois catégories les mRNA présents dans une cellule (Bennet et Ciegler, 1983). Vingt à trente gènes sont fortement exprimés, c'est-à-dire de 200 à 1 000 copies de mRNA par cellule. Deux cents à quatre cents gènes sont moyennement exprimés, c'est-à-dire de 20 à 150 copies de mRNA par cellule. Les autres gènes sont faiblement exprimés, c'est-à-dire de 1 à 11 copies de mRNA par cellule. Avec la méthode que nous avons utilisée, nous pensons avoir été en mesure d'aller chercher des gènes de la première et de la deuxième catégorie. Ceux de la troisième catégorie nous ont peut-être échappé puisque nous ne faisons aucune étape d'enrichissement. Mentionnons aussi que la différence d'expression d'un gène donné entre les cultures induites et non induites devait être suffisante pour compenser la variabilité du signal lors de l'hybridation. De plus, nous n'avons pas pu détecter des gènes qui sont à proximité de gènes constitutifs fortement exprimés. Comme le DNA de Trametes versicolor semble être très activement transcrit (voir résultats), il est probable que certains gènes nous ont échappé pour cette raison. Nous ne pouvions pas non plus isoler des gènes dont les mRNA sont instables, qui n'ont pas de queue de poly A ou encore sur lesquels la transcriptase inverse agit mal.

Si on regarde les purifications des clones (figure 2), il

n'y a aucun doute qu'à un certain moment, dans des cultures induites, certains gènes ont été fortement exprimés. C'est d'ailleurs là la base de notre sélection. Dans la plupart des cas, nous avons obtenu des "Northern blots" qui confirmaient que ces clones avaient une expression différentielle. Il est probable que sur les 49 clones de départ, d'autres que les 18 que nous avons purifiés ont une expression différentielle à un moment donné. Quand nous avons tenté la purification de ces clones, nous avons obtenu des signaux très faibles. Pour parvenir à les purifier, il faudrait reproduire les conditions de culture qui leur permettent de s'exprimer. En fait, le passage d'une culture en métabolisme secondaire est un phénomène complexe qui exige des conditions de croissance très contrôlées. Par exemple, si le rythme de croissance n'est pas approprié, certains métabolites qui apparaissent normalement après la phase primaire de croissance ne seront pas présents dans la culture (Bennet et Ciegler, 1983). Un autre exemple est celui de la sporulation. On sait que les conditions qui favorisent la formation de spores sont plus spécifiques, plus restreintes que celles qui favorisent la croissance du mycélium (Bennet et Ciegler, 1983). Le type et la quantité de nourriture disponible sont les facteurs les plus importants. Cependant, la sporulation nécessite des conditions particulières de température, de pH, d'aération, etc. Il semble donc que le passage d'une culture en métabolisme secondaire est un

phénomène mal connu dont certains paramètres sont difficiles à contrôler. Ainsi, il se peut que certains clones qui étaient exprimés dans les premières cultures induites ne l'aient plus été par la suite à cause de changements de conditions que nous ne contrôlions pas. Il se peut aussi que certains gènes aient un temps d'induction très court, ce qui rend l'isolement des RNA très difficile. Une de ces possibilités pourrait expliquer pourquoi avec le clone 10, par exemple, nous n'avons pas obtenu de "Northern blot" qui montrait une expression différentielle.

Quand nous avons fait des "Northern blots" avec des RNA non induits provenant d'une culture en extrait de malt, nous avons noté l'apparition de nouveaux RNA. Comme les conditions de croissance d'une culture en extrait de malt sont passablement différentes des conditions présentes dans un milieu synthétique, il n'est pas surprenant que des gènes différents soient exprimés dans une culture en extrait de malt. Cependant, est-il possible qu'un bout de DNA d'environ 10 Kb hybride avec autant de messagers différents? Théoriquement, cela est possible. Si on estime la taille d'un mRNA moyen à 1 200 nucléotides, une insertion de 10 Kb pourrait contenir 8 messagers différents puisque les mRNA chez les champignons ne proviennent pas d'un long hnRNA (Bennet et Diegler, 1983). Comme il y a très peu de DNA répétitif dans le génome des champignons (entre 2 et 16% selon l'espèce

étudiée) (Bennet et Ciegler, 1983) et que ce DNA répétitif n'est pas distribué au hasard dans le génome, toute l'insertion pourrait être du DNA codant. Les gènes associés à la sporulation qui ont été isolés chez Saccharomyces cerevisiae (Clancy et al., 1983; Percival-Smith et Segall, 1984) et les gènes associés au développement chez Aspergillus (Zimmermann et al., 1980) présentent aussi un patron similaire sur "Northern blot" c'est-à-dire qu'un clone hybride avec plusieurs mRNA différents. Dans certains cas, il se pourrait qu'on ait une hybridation croisée entre le DNA du clone et un messenger non codé par ce bout de DNA. Dans d'autres cas, on pourrait avoir affaire à un messenger qui a plusieurs sites d'initiation ou de terminaison de la transcription. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour distinguer laquelle de ces possibilités s'applique vraiment dans chacun des cas. On peut cependant affirmer que le DNA de Trametes versicolor semble être très activement transcrit.

Nous avons donc isolé 9 séquences de DNA différentes qui ont une expression différentielle dans des cultures de Trametes versicolor. Comme le clone 8 et ceux de la série homologue à 15 n'ont pas le même fragment induit, il se pourrait qu'on ait affaire à des gènes liés. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier la structure génomique de ces gènes et voir s'ils sont vraiment à proximité sur le DNA de Trametes versicolor. Il faudrait par la suite

regarder si leur cinétique d'induction est la même et, dans l'affirmative, voir s'ils ont des promoteurs semblables.

Pour l'instant, nous ne connaissons pas le produit des gènes que nous avons isolés. Pour déterminer quels gènes ont un lien avec le système ligninolytique, il faudrait suivre l'apparition dans le temps des mRNA de ces gènes dans une culture de Trametes versicolor. Ceux dont la cinétique d'induction suivra l'activité ligninolytique de la culture seront les plus intéressants à étudier. Des clones sont présentement en cours d'analyse. Il semblerait que certains ont une induction qui suit l'apparition du système ligninolytique alors que d'autres sont induits indépendamment de l'activité ligninolytique (Pierre Trudel, communication personnelle). Après avoir précisé quel fragment de restriction du clone contient le gène induit (ou une portion de ce gène), il faudrait hybrider ce fragment de DNA avec des messagers, faire une traduction in vitro sur ces mRNA et comparer la protéine obtenue avec les protéines extracellulaires d'une culture induite, en faisant du "peptide mapping" par exemple. On pourrait tester si ces protéines traduites in vitro ont une certaine capacité à oxyder différents substrats. On pourrait aussi cloner ces gènes dans un vecteur d'expression chez les levures. Après transformation, on pourrait induire le métabolisme secondaire chez les levures et voir si les gènes clonés sont bien

exprimés et induits dans cet organisme. Comme les levures sont beaucoup mieux connues et caractérisées que les moisissures au point de vue génétique, l'étude des gènes purifiés chez Trametes versicolor serait grandement facilitée s'ils pouvaient s'exprimer efficacement chez la levure.

En conclusion, dans ce travail, nous avons cloné 9 gènes exprimés de façon différentielle en utilisant une technique fort simple. Certains de ces gènes pourraient être liés à l'activité ligninolytique chez Trametes versicolor. En purifiant ainsi les gènes liés au système ligninolytique de la moisissure, on pourra enfin éclaircir le fonctionnement de ce système si complexe.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Pierre Chartrand, qui m'a permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Grâce à lui et à son équipe, j'ai pu effectuer ce travail dans la joie et l'amitié.

Je voudrais remercier plus particulièrement Pierre Trudel qui, avec beaucoup de patience et d'attention, m'a aidée et conseillée sans relâche.

Je remercie aussi le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour son aide financière.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bennet, J.W., et A. Ciegler (éditeurs). 1983. Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, Chapitres 1, 2, 3, 6 et 7.
2. Benton, W.D., et R.W. Davis. 1977. Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182.
3. Borgmeyer, J.R., et D.L. Crawford. 1985. Production and characterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different Streptomyces spp. Appl. Environ. Microbiol. 49: 273-278.
4. Chartrand, P., N. Gusew-Chartrand, et P. Bourgaux. 1981. Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells. J. Virol. 39: 185-195.
5. Clancy, M.J., B. Buten-Magee, D.J. Straight, A.L. Kennedy, R.M. Partridge, et P.T. Magee. 1983. Isolation of genes expressed preferentially during sporulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3000-3004.
6. Dons, J.J.M., O.M.H. De Vries, et J.G.H. Wessels. 1979. Characterization of the genome of the basidiomycete Schizophyllum commune. Biochim. Biophys. Acta 563: 100-112.
7. Dutta, S.K. 1974. Repeated DNA sequences in fungi. Nucleic Acids Res. 1: 1411-1419.
8. Evans, C.S., et J.M. Palmer. 1983. Ligninolytic activity of Coriolus versicolor. J. Gen. Microbiol. 129: 2103-2108.
9. Faison, B.D., et T.K. Kirk. 1983. Relation between lignin degradation and production of reduced oxygen species by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1140-1145.
10. Faison, B.D., et T.K. Kirk. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 49: 299-304.
11. Forney, L.J., C.A. Reddy, M. Tien, et S.D. Aust. 1982. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. J. Biol. Chem. 257: 11455-11462.

12. Glenn, J.K., et M.H. Gold. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin - degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1741-1747.
13. Glenn, J.K., et M.H. Gold. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II) - dependent peroxidase from the lignin - degrading basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. Arch. Biochem. Biophys. 242: 329-341.
14. Gold, M.H., M. Kuwahara, A.A. Chiu, et J.K. Glenn. 1984. Purification and characterization of an extracellular H₂O₂ - requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. Arch. Biochem. Biophys. 234: 353-362.
15. Gold, M.H., M.B. Mayfield, T.M. Cheng, K. Krisnangkura, M. Shimada, A. Enoki, et J.K. Glenn. 1982. A Phanerochaete chrysosporium mutant defective in lignin degradation as well as several other secondary metabolic functions. Arch. Microbiol. 132: 115-122.
16. Hata, K. 1966. Investigations on lignins and lignification decayed by Poria subacida. Holzforschung 20: 142-147.
17. Ishikawa, H., W.J. Schubert, et F.F. Nord. 1963. Investigations on lignins and lignification. XXVIII. The degradation by Polyporus versicolor and Fomes fomentarius of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. Arch. Biochem. Biophys. 100: 131-139.
18. Kersten, P.J., M. Tien, B. Kalyanaraman, et T.K. Kirk. 1985. The ligninase of Phanerochaete chrysosporium generates cation radicals from methoxybenzenes. J. Biol. Chem. 260: 2609-2612.
19. Keyser, P., T.K. Kirk, et J.G. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of Phanerochaete chrysosporium: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. J. Bacteriol. 135: 790-797.
20. Kirk, T.K., et H.-M. Chang. 1975. Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. Holzforschung 29: 56-64.

21. Kirk, T.K., W.J. Connors, et J.G. Zeikus. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 192-194.
22. Kirk, T.K., T. Higuchi, et H.-M. Chang (éditeurs). 1980. *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. CRC Press Inc., Floride, Volumes I et II.
23. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz, et J.G. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by Phanerochaete chrysosporium. *Arch. Microbiol.* 117: 277-285.
24. Kutsuki, H., et M.H. Gold. 1982. Generation of hydroxyl radical and its involvement in lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 320-327.
25. Liwicki, R., A. Paterson, M.J. MacDonald, et P. Broda. 1985. Phenotypic classes of phenoloxidase - negative mutants of the lignin - degrading fungus Phanerochaete chrysosporium. *J. Bacteriol.* 162: 641-644.
26. Malmström, G., G. Fåhræus, et R. Mosbach. 1958. Purification of laccase. *Biochem. Biophys. Acta* 28: 652-653.
27. Maniatis, T., E.F. Fritsch, et J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
28. McCarthy, A.J., et P. Broda. 1984. Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against [¹⁴C] lignin-labelled wheat lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2905-2913.
29. McCarthy, A.J., M.J. MacDonald, A. Paterson, et P. Broda. 1984. Degradation of [¹⁴C] lignin-labelled wheat lignocellulose by white-rot fungi. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1023-1030.
30. McMaster, G.K., et G.G. Carmichael. 1977. Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4835-4838.

31. Meinkoth, J., et G. Wahl. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analyt. Biochem.* 138: 267-284.
32. Nakatsubo, F., I.D. Reid, et T.K. Kirk. 1981. Involvement of singlet oxygen in the fungal degradation of lignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 484-491.
33. Odier, E., G. Janin, et B. Monties. 1981. Poplar lignin decomposition by gram-negative aerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 337-341.
34. Paszczynski, A., V. Huynh, et R. Crawford. 1986. Comparison of Ligninase-I and Peroxidase-M2 from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 750-765.
35. Percival-Smith, A., et J. Segall. 1984. Isolation of DNA sequences preferentially expressed during sporulation in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 4: 142-150.
36. Raeder, U., et P. Broda. 1984. Comparison of the lignin-degrading white rot fungi Phanerochaete chrysosporium and Sporotrichum pulverulentum at the DNA level. *Current Genetics* 8: 499-506.
37. Rave, N., R. Crkvenjakov, et H. Boedtker. 1979. Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 6: 3559-3567.
38. Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes, et P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
39. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
40. St-John, T.P., et R.W. Davis. 1979. Isolation of galactose-inducible DNA sequences from Saccharomyces cerevisiae by differential plaque filter hybridization. *Cell* 16: 443-452.
41. Tien, M., et T.K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium burds. *Science* 221: 661-663.

42. Tien, M., et T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂ -requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284.
43. Timberlake, W.E. 1980. Developmental gene regulation in Aspergillus nidulans. Dev. Biol. 78: 497-510.
44. Timberlake, W.E., D.S. Shumard, et R.B. Goldberg. 1977. Relationship between nuclear and polysomal RNA populations of Achlya: a simple eucaryotic system. Cell 10: 623-632.
45. Ulmer, D.C., M.S.A. Leisola, B.H. Schmidt, et A. Fiechter. 1983. Rapid degradation of isolated lignins by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1795-1801.
46. van der Ploeg, L.H.T., et R.A. Flavell. 1980. DNA methylation in the human $\gamma\delta\beta$ -globin locus in erythroid and non-erythroid tissues. Cell 19: 947-958.
47. Zimmermann, C.R., W.C. Orr, R.F. Leclerc, E.C. Barnard, et W.E. Timberlake. 1980. Molecular cloning and selection of genes regulated in Aspergillus development. Cell 21: 709-715.